



Departamento de Biología Molecular

**Factores determinantes del reconocimiento de
nucleótidos en el virus de la fiebre aftosa**

TESIS DOCTORAL

Ignacio de la Higuera Hernández

Madrid, 2014

Factores determinantes del reconocimiento de nucleótidos en el virus de la fiebre aftosa

Memoria presentada por Ignacio de la Higuera Hernández, adscrito al Departamento de Biología Molecular, para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

El trabajo ha sido realizado bajo la dirección del profesor Esteban Domingo Solans en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas y a la Universidad Autónoma de Madrid, gracias a una ayuda predoctoral (PFIS) concedida por el Instituto de Salud Carlos III.



El licenciado D. Ignacio de la Higuera Hernández ha realizado bajo mi dirección el trabajo experimental que se describe en la presente memoria bajo el título "Factores determinantes del reconocimiento de nucleótidos en el virus de la fiebre aftosa", presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Fdo. Esteban Domingo Solans

Profesor de investigación del CSIC

Madrid, febrero de 2014

*A mi madre, mi padre,
mi hermana y mi hermano*

Agradecimientos / Acknowledgements

En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento al profesor Esteban Domingo por haberme acogido en su laboratorio, por las muchas horas de dedicación y por su apoyo constante.

Las investigaciones de las cuales deriva la presente memoria no hubiesen sido posibles sin el trabajo en equipo con mis compañer@s de laboratorio. Agradezco enormemente a Rubén Agudo, de quien tanto aprendí en los comienzos de mi formación como investigador, su paciencia y atención; a Armando Arias, porque fue apoyo científico importante en mis inicios; a Celia Perales, porque siempre está ahí cuando se le necesita (que no son pocas veces); a Ana Isabel de Ávila, porque su intachable gestión del laboratorio y su sentido del humor han hecho más fácil el día a día; a Mariu Benítez, por su excelente ayuda técnica; a Isabel Gallego, por su sonrisa diaria; a Nathan Beach, por sus acertadas críticas científicas y lingüísticas; a Elena Moreno, por la ayuda prestada con todo lo relacionado al M16A y con los análisis estadísticos; a Ana Ortega, por ser tan dicharachera, y a Julie, por su simpatía y su delicioso *brownie*. Me tomo la libertad de incluir como "compañer@s de laboratorio" a los miembros del laboratorio 124 Mar Álvarez, Verónica Barrioluengo y Gilberto Betancor, por haberme ayudado tanto en cuestiones de bioquímica, así como por todos los "préstamos" de los cuales han sido "víctimas". También incluyo en este párrafo a Flavia Caridi, que durante una época pasó más tiempo en nuestro laboratorio que en el suyo, realizando muchos de los ensayos que se describen en esta tesis y con los que tanto hemos aprendido.

Special thanks to Dr. Stefan G. Sarafianos and Dr. Kamal Singh for giving me the opportunity to work and learn in such a prestigious lab during my 6-months stay in Columbia, Missouri. I also want to acknowledge Lefteris Michailidis, Karen Kirby, and the whole Sarafiano's lab, as well as Pintel's and Burke-Agüero's labs for all the help and nice-treat received from them. I also had a great time in Columbia thanks to my good missourian friends Sam, Thomas, Dan, Ivy, all the people from The Hair Hole and from Diva Haus; and Sergio Camero, whose name could appear in many paragraphs of this section.

Durante el desarrollo de esta tesis hemos colaborado con las estructurólogas Nuria Verdaguer y Cristina Ferrer Orta, del Instituto de Biología Molecular de Barcelona. También hemos colaborado con Pachi Sobrino, del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CBM). Les agradezco la sinergia establecida para aportar sentido e interés adicional a nuestras investigaciones.

En el ámbito profesional tengo la suerte de haber conocido a gente fabulosa, a la que tengo que agradecer el haber compartido buenos momentos en el CBM y fuera de él: a Gayetri, Noé, Akbar, Haleh, Juan García Arriaza, Laura Lerma, a toda la gente del laboratorio 105 y a los muchos que se me olvidan en este momento.

Por último y no menos importante, considero que mi vida en Madrid no se hubiese hecho tan amena sin gente tan excepcional como: Ana y Anita, Álvaro, Chinchí, Gergö, Jaime, Elena, Berni, Juanico, Mapi, Pablo, Lucas, Chema, Irene, Juan, Héctor, Laura, César y el resto de la kenpo-family. Y no me puedo olvidar de mi hermano Manu, que además me ha ayudado con el diseño de la portada y de algunas de mis presentaciones en congresos.

Abreviaturas

A	adenosina/adenosina-5'-monofosfato en un molde de RNA
AAA+	ATPasas asociadas a varias actividades celulares (<i>ATPasas associated with diverse cellular activities</i>)
ADP	adenosina-5'-difosfato
AK	adenosina kinasa
AMP	adenosina-5'-monofosfato
ATP	adenosina-5'-trifosfato
AZC	5-azacitidina
BHK	riñón de hámster cachorro (<i>baby-hamster kidney</i>)
BSA	seroalbúmina bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
C	citosa-5'-monofosfato en un molde de RNA
C-terminal	carboxi-terminal
cDNA	DNA complementario
cre	elemento de replicación en <i>cis</i> (<i>cis acting replication element</i>)
CTP	citidina-5'-trifosfato
CVB3	virus de Coxsackie B3 (<i>coxsackievirus B3</i>)
dADP	2'-desoxiadenosina-5'-difosfato
dATP	2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCMP	2'-desoxicitidina-5'-monofosfato
DEAE	dietilaminoetanol
DENV	virus del dengue (<i>denguevirus</i>)
dGDP	2'-desoxiguanosina-5'-difosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato
DMD	G118D-V239M-G373D
DMEM	medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>)
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico (<i>desoxirribonucleic acid</i>)

dNTP	2'-desoxinucleótido-5'-trifosfato
dTDP	2'-desoxitimidina-5'-difosfato
dTMP	2'-desoxitimidina-5'-monofosfato
DTT	ditiotreitól
dTTP	2'-desoxitimidina-5'-trifosfato
dUMP	2'-desoxiuridina-5'-monofosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiaminotetraacetato
EMSA	ensayo de retardo en gel (<i>electrophoretic mobility shift assay</i>)
EoV	virus de <i>Ectropis oblicua</i> (<i>Ectropis obliqua virus</i>)
FdUDP	5-fluorodesoxiuridina-5'-difosfato
FdUMP	5-fluorodesoxiuridina-5'-monofosfato
FdUTP	5-fluorodesoxiuridina-5'-trifosfato
FMDV	virus de la fiebre aftosa (<i>foot-and-mouth disease virus</i>)
FU	5-fluorouracilo
Fu	5-fluorouridina-5'-monofosfato en un molde de RNA
FUDP	5-fluorouridina-5'-difosfato
FUMP	5-fluorouridina-5'-monofosfato
FUr	5-fluorouridina
FUTP	5-fluorouridina-5'-trifosfato
G	guanosina/guanosina-5'-monofosfato en un molde de RNA
GDI	genoma defectivo interferente
GDP	guanosina-5'-difosfato
GMP	guanosina-5'-monofosfato
GST	glutación S-transferasa
GTP	guanosina-5'-trifosfato
GuH	hidrocloruro de guanidino
HCV	virus de la hepatitis C (<i>hepatitis C virus</i>)

ABREVIATURAS

HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperacinetanosulfonato
IMP	inosín-5'-monofosfato
IMPDH	inosín-monofosfato deshidrogenasa
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IRES	sitio interno de entrada de ribosomas (<i>internal ribosome entry site</i>)
KAKA	K18A-K20A
LB	caldo de lisogenia (<i>lysogeny broth</i>)
LCMV	virus de la coriomeningitis linfocitaria de ratón (<i>lymphocytic choriomeningitis virus</i>)
m.d.i.	multiplicidad de infección
Mg ⁺⁺	catión de magnesio
Mn ⁺⁺	catión de manganeso
MOPS	3N-morfolín-propil-sulfonato
N-terminal	amino-terminal
Ni-NTA	níquel-nitrilotriacetato
NLS	señal de localización nuclear (<i>nuclear localization signal</i>)
NTP	ribonucleótido-5'-trifosfato
oligo(dT ₁₅)	oligonucleótido de 15 desoxitimidinas
OPRT	ororato fosforribosiltransferasa
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PAM	mutación puntual aceptada (<i>point accepted mutation</i>)
PBS	tampón fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	banco de datos de proteínas (<i>protein data bank</i>)
PEI	polietilendiamina
PFU	unidad formadora de placa (<i>plaque-forming unit</i>)
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoruro
Poli(A)	poliadenilato

Poli(C)	policitidilato
Poli(U)	poliuridilato
PPi	pirofosfato
PRPP	fosforribosil pirofosfato
PV	poliovirus
R	ribavirina/ribavirina-5'-monofosfato incorporado en un molde de RNA
r.p.m.	revoluciones por minuto
RdRP	polimerasa de RNA dependiente de RNA (<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)
RMP	ribavirina-5'-monofosfato
RNA	ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAsin	inhibidor de RNAsas
RNP	ribonucleoproteína
RT	retrotranscriptasa
RT-PCR	reacción de transcripción inversa seguida de amplificación por PCR (<i>retrotranscriptase PCR</i>)
RTP	ribavirina-5'-trifosfato
SBF	suero bovino fetal
SDS	dodecil sulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Sn	entropía normalizada de Shannon
SSI	P44S-P169S-M296I
sym/sub	sustrato simétrico (<i>symmetrical/substrate</i>)
T	2'-desoxitimidina-5'-monofosfato en un molde de DNA
TLC	cromatografía en capa fina (<i>thin layer chromatography</i>)
TP	timidín fosforilasa
TS	timidilato sintasa
U	uracilo/uridina-5'-monofosfato incorporado en un molde de RNA
UK	uridín kinasa
UMP	uridina-5'-monofosfato

ABREVIATURAS

UP	uridín fosforilasa
UTP	uridina-5'-trifosfato
UTR	región no codificante (<i>untranslated region</i>)
VFA	virus de la fiebre aftosa
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
VPg	proteína viral asociada al genoma (<i>viral protein genome-linked</i>)
VSV	virus de la estomatitis vesicular (<i>vesicular stomatitis virus</i>)
<i>wt</i>	tipo silvestre (<i>wild-type</i>)
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactósido
XMP	xantina-5'-monofosfato

Códigos de una y tres letras de los aminoácidos

Alanina	Ala, A	Leucina	Leu, L
Arginina	Arg, R	Lisina	Lys, K
Ácido aspártico	Asp, D	Metionina	Met, M
Asparagina	Asn, N	Fenilalanina	Phe, F
Cisteína	Cys, C	Prolina	Pro, P
Ácido glutámico	Glu, E	Serina	Ser, S
Glicina	Gly, G	Tirosina	Tyr, Y
Glutamina	Gln, Q	Treonina	Thr, T
Histidina	His, H	Triptófano	Trp, W
Isoleucina	Ile, I	Valina	Val, V

Índice

	Página
1. Summary / Resumen	1
2. Introducción	3
2.1 Virus RNA y variabilidad genética. Cuasiespecies víricas	3
2.1.1 Variabilidad genética de las poblaciones de virus RNA	3
2.1.2 Cuasiespecies víricas	4
2.2 Catástrofe de error y mutagénesis letal	5
2.3 El virus de la fiebre aftosa	7
2.4 La polimerasas del VFA	9
2.5 Proteína 2C	14
2.6 Ribavirina	17
2.7 5-Fluorouracilo	20
3. Objetivos	25
4. Materiales y Métodos	27
4.1 Cultivo de células eucarióticas	27
4.2 Virus	27
4.3 Agentes antivirales	28
4.4 Infecciones de células BHK-21 por el VFA	29
4.4.1 Infecciones en medio líquido	29
4.4.2 Infecciones en medio semisólido. Titulación	30
4.5 Extracción del RNA viral	30
4.6 Obtención de cDNA y amplificación por RT-PCR	30
4.7 Purificación de DNA amplificado	32
4.7.1 Purificación de DNA por filtración	32
4.7.2 Extracción de banda en gel de agarosa	32
4.8 Secuenciación de DNA	32
4.9 Cuantificación de moléculas de RNA vírico mediante RT-PCR a tiempo real	33
4.10 Clonaje molecular para el análisis de cuasiespecies del VFA	34
4.11 Determinación de la eficacia biológica	34
4.12 Determinación de la frecuencia de mutación y entropía normalizada de Shannon de los espectros de mutantes	35
4.13 Obtención de clones biológicos del VFA	36
4.14 Obtención de clones infecciosos del VFA	36
4.15 Transcripción de clones infecciosos	38
4.16 Transfección de RNA viral procedente de la transcripción de clones infecciosos	38
4.17 Construcción de plásmidos de expresión de proteínas	39
4.17.1 Construcción de plásmidos de expresión de 3D	39
4.17.2 Construcción de plásmidos de expresión de 2C	40
4.18 Expresión de 2C y 3D recombinantes en <i>E.coli</i>	41
4.19 Purificación de 3D y 2C	41

4.20 Ensayos de actividad de la polimerasa del VFA	42
4.20.1 Ensayo de síntesis de un homopolímero	42
4.20.2 Ensayos de uridilación de VPg	43
4.21 Preparación de complejos molde-cebador heteropoliméricos.....	44
4.21.1 Marcaje en 5' de complejos molde-cebador con ³² P.....	44
4.21.2 Hibridación de RNA	45
4.22 Ensayo de retardo de RNA en gel	45
4.23 Ensayos de incorporación de nucleótidos	45
4.23.1 Ensayos de incorporación de nucleótidos en sym/sub	45
4.23.2 Ensayos de incorporación mediante <i>Rapid Quench Flow</i>	46
4.23.3 Análisis de datos cinéticos en condiciones de estado pre- estacionario	47
4.23.4 Ensayo de procesividad	47
4.24 Ensayos de actividad de la proteína 2C del VFA	48
4.24.1 Ensayos de actividad ATPasa	48
4.24.2 Ensayos de desestabilización de ácidos nucleicos	48
4.25 Disoluciones y tampones utilizados	49
5. Resultados	51
5.1 Variantes del VFA resistentes a ribavirina	51
5.1.1 Cinética de crecimiento de poblaciones del VFA en ausencia y presencia de ribavirina	51
5.1.2 Aparición de mutaciones secundarias tras pases sucesivos del pMT28-3D(G62S-M296I)	53
5.1.3 Las polimerasas mutantes incorporan menos ribavirina que la polimerasa <i>wt</i> en ensayos bioquímicos	54
5.1.4 La sustitución G62S provoca descensos de actividad enzimática de la polimerasa	55
5.2 Variantes de VFA seleccionados en presencia de 5-fluorouracilo	60
5.2.1 Cinética de crecimiento de poblaciones del VFA en ausencia y presencia de 5-fluorouracilo	60
5.2.2 Pases seriados de pMT28 <i>wt</i> y pMT28-3D(V173I) en presencia de 5-fluorouracilo	61
5.2.3 Niveles de RNA viral e infectividad específica de las poblaciones pMT28 <i>wt</i> y pMT28-3D(V173I) pasadas en presencia o ausencia de 5- fluorouracilo	63
5.2.4 Análisis del espectro de mutantes de poblaciones de pMT28 <i>wt</i> y pMT28-3D(V173I)	64
5.2.5 Eficacia biológica (<i>fitness</i>) relativa de pMT28-3D(V173I) en ausencia y presencia de 5-fluorouracilo	67
5.2.6 Efecto de la frecuencia de mutación sobre adaptabilidad	69
5.2.7 Actividad enzimática de las polimerasas 3D <i>wt</i> y 3D(V173I)	71
5.2.8 Unión de las polimerasas 3D <i>wt</i> y 3D(V173I) al RNA	71
5.2.9 Influencia de la sustitución V173I en la inhibición por FUTP de la uridilación de VPg	72
5.2.10 Cinéticas de incorporación de nucleótidos correctos por 3D <i>wt</i> y 3D(V173I) en estado pre-estacionario	73
5.2.11 Cinéticas de incorporación de FUMP por 3D <i>wt</i> y 3D(V173I)	74
5.2.12 Reconocimiento de fluorouracilo en el RNA molde	81
5.2.13 Cinéticas de incorporación de nucleótidos incorrectos por 3D <i>wt</i> y 3D(V173I)	81

5.3 Caracterización bioquímica de variantes de 3D con sustituciones en una región del extremo amino-terminal	87
5.3.1 Unión a RNA de 3D con sustituciones en la zona amino-terminal ..	88
5.3.2 Actividad enzimática de 3D con sustituciones en la zona amino-terminal	91
5.3.3 Reconocimiento de nucleótidos por 3D con sustituciones en la zona amino-terminal	99
5.3.4 Efecto de la sustitución M16A en la actividad de 3D	103
5.3.5 Efecto de la sustitución M16A en reconocimiento de nucleótidos ..	109
5.4 Actividad de la proteína 2C del VFA <i>in vitro</i>	114
5.4.1 Clonaje, expresión y purificación de la proteína 2C del VFA con una delección de 33 aminoácidos	114
5.4.2 Actividad ATPasa de 2C ₍₃₄₋₃₁₈₎	115
5.4.3 Actividad helicasa de 2C ₍₃₄₋₃₁₈₎	116
5.4.4 Requerimientos de molde para la separación de la doble hebra por la proteína 2C ₍₃₄₋₃₁₈₎	118
5.4.5 Requerimientos energéticos de la proteína 2C ₍₃₄₋₃₁₈₎ para desestabilizar ácidos nucleicos	120
6. Discusión	123
6.1 Análisis de las sustituciones M196I y G62S, implicadas en resistencia a ribavirina (R)	123
6.1.1 La sustitución G62S es deletérea para el VFA	123
6.1.2 Las sustituciones M296I y G62S confieren al VFA menor sensibilidad a la acción mutagénica de R	124
6.2 Sustitución V173I y adaptación a 5-fluorouracilo	126
6.2.1 Aparición y selección de V173I	126
6.2.2 La sustitución V173I estabiliza el patrón de transiciones del virus pasado en presencia de FU, mediante modulación de los parámetros de incorporación de nucleótidos	127
6.2.3 La sustitución V173I es ventajosa en presencia de FU, pero supone un coste de eficacia biológica para el VFA	128
6.3 Análisis funcional del extremo amino-terminal de 3D	130
6.3.1 Cambios en los residuos 18 y 20 de la polimerasa del VFA son deletéreos para el virus	130
6.3.2 Cambios en los residuos 18 y 20 de la polimerasa afectan la unión al RNA	131
6.3.3 Cambios en los residuos 18 y 20 de la polimerasa afectan al reconocimiento de nucleótidos	132
6.3.4 Reconocimiento de nucleótidos por 3D(M16A)	132
6.4. La proteína 2C del VFA podría ser una chaperona de ácidos nucleicos ..	134
7. Conclusiones	137
8. Bibliografía	139
9. Anexo	155

1 Summary

RNA virus populations consist of mutant spectra termed quasispecies. The large heterogeneity in quasispecies is influenced by high mutation rates, due to the low fidelity of the viral polymerase (RNA dependent RNA polymerase or RdRP). The RdRPs polymerize with copy fidelity close to a theoretical error threshold, above which there is a loss of genetic information. Infringement of this threshold by increasing the error rate is known as entry into error catastrophe and can be driven by the use of mutagenic agents. This antiviral strategy is termed lethal mutagenesis. The main objective of this PhD thesis is to characterize the viral determinants that are involved in sensitivity of foot-and-mouth disease virus (FMDV) to mutagenic agents.

FMDV belongs to the family *Picornaviridae*, a group of positive single stranded RNA viruses associated with a large number of human and animal diseases. Ribavirin (R) and 5-fluorouracil (FU) are mutagenic for FMDV. Passaging FMDV in the presence of R or FU resulted in the selection of escape mutants. Here, we characterize the mutants containing the substitutions G62S and M296I in protein 3D (FMDV's polymerase) that are involved in R resistance, as well as the mutant containing the substitution V173I in 3D, selected upon treatment with FU. *In vitro* studies with purified polymerases have shown that these 3D substitutions confer an altered capacity to use the nucleotide analogues as substrates, as compared with the wild-type (wt) enzyme. Substitution V173I helps to correct the unbalanced mutational bias observed in the presence of FU, presumably by modulating nucleotide incorporation parameters. In addition, 3Ds with substitutions in residues 18 and 20 showed a highly impaired RNA binding and a surprising increased capacity to use ribavirin-triphosphate (RTP) as substrate. These studies led to the identification of a fidelity determinant at position M16, located in a key position for recognition of incoming nucleotides.

Also, we have expressed and purified a truncated form of FMDV 2C, a viral protein also involved in sensitivity to mutagenic agents. In this PhD thesis we show that 2C helps to unwind double stranded DNA in an ATP-independent manner. This result can help to unveil the role of 2C in viral replication and the molecular mechanisms by which 2C confers decreased sensitivity to lethal mutagenesis.

2 Introducción

2.1 Virus RNA y variabilidad genética. Cuasiespecies víricas

Los virus son entidades biológicas con capacidad replicativa pero carentes de metabolismo, de modo que dependen de la célula para perpetuarse. Por este motivo se comportan como parásitos moleculares, dando lugar a la infección. El material genético de los virus puede ser DNA o RNA.

2.1.1 Variabilidad genética de las poblaciones de virus RNA

Los virus RNA se caracterizan por poseer una elevada variabilidad y heterogeneidad genética que les confiere una gran capacidad adaptativa (Biebricher & Domingo, 2007; Domingo *et al.*, 2012). Las poblaciones de virus RNA deben su alta variabilidad genética principalmente a altas tasas de error durante la replicación viral (Batschelet *et al.*, 1976; Castro *et al.*, 2005; Domingo *et al.*, 1978; Drake, 1991; Drake & Holland, 1999), recombinación (Agol, 2006; Agol, 2010; Gallei *et al.*, 2004; Mikkelsen & Pedersen, 2000; Simmonds, 2010), reordenamientos genéticos (Greenbaum *et al.*, 2012; Stincarelli *et al.*, 2013; Webster, 1999; Zimmer & Burke, 2009) y ausencia de mecanismos de reparación celulares (Friedberg *et al.*, 2006).

Numerosas enfermedades de importancia médica, veterinaria y agroalimentaria están causadas por virus con genoma de RNA. El control de dichas enfermedades se ve gravemente dificultado por la variabilidad genética de los virus RNA, que permite la rápida selección de mutantes de escape a la respuesta inmune del hospedador, a compuestos antivirales y a RNAs interferentes entre otras fuerzas selectivas (Baranowski *et al.*, 2003; Domingo *et al.*, 2012; Melnick *et al.*, 1961). La aparición de resistencia supone uno de los grandes desafíos para el tratamiento de enfermedades víricas, por lo que nuevas estrategias antivirales han de ser exploradas.

2.1.2 Cuasiespecies víricas

Las elevadas tasas de error, los tiempos de replicación cortos y el elevado tamaño poblacional hacen que las poblaciones de virus RNA consistan en espectros o nubes de mutantes conocidos como cuasiespecies víricas (Domingo *et al.*, 1978; Domingo *et al.*, 2012; Eigen, 1993; Holland *et al.*, 1982; Manrubia *et al.*, 2005; Nowak, 1992). Los mutantes de una cuasiespecie están sometidos a un continuo proceso de variación genética, competición y selección.

El término cuasiespecie surgió del modelo teórico que Manfred Eigen y Peter Schuster propusieron para explicar la estructura poblacional y adaptabilidad de replicones de RNA en un posible escenario del origen de la vida (Biebricher & Eigen, 2006; Eigen, 1971; Eigen & Biebricher, 1988; Eigen & Schuster, 1979). El fago Q β , el virus de la fiebre aftosa (VFA) y el virus de la estomatitis vesicular (VSV) sirvieron como modelos iniciales para demostrar la organización de poblaciones víricas en estructura de cuasiespecies (Domingo *et al.*, 1980; Domingo *et al.*, 1978; Holland *et al.*, 1982; Sobrino *et al.*, 1983). Desde entonces, la teoría de cuasiespecies se ha aplicado también a ciertos virus DNA (Ge *et al.*, 2007), bacterias (Webb & Blaser, 2002), priones (Weissmann *et al.*, 2011) y a cáncer (Fox & Loeb, 2010; Sole & Deisboeck, 2004).

Una cuasiespecie está representada por una secuencia consenso, que es un promedio de todos los genomas de la población, y un espectro o nube de mutantes (Figura 2.1). La secuencia consenso puede no estar presente en la población. Una cuasiespecie suele estar dominada por una secuencia maestra, que es aquella que presenta un mayor grado de eficacia biológica (Biebricher & Eigen, 2006). Los componentes de los espectros de mutantes pueden interaccionar entre sí positiva (complementación) o negativamente (interferencia), de modo que la eficacia biológica de una cuasiespecie generalmente no se corresponde con la eficacia media de sus componentes. Estas, y otras evidencias experimentales sugieren que la población viral en su conjunto se comporta como una unidad de selección (Domingo *et al.*, 2012).

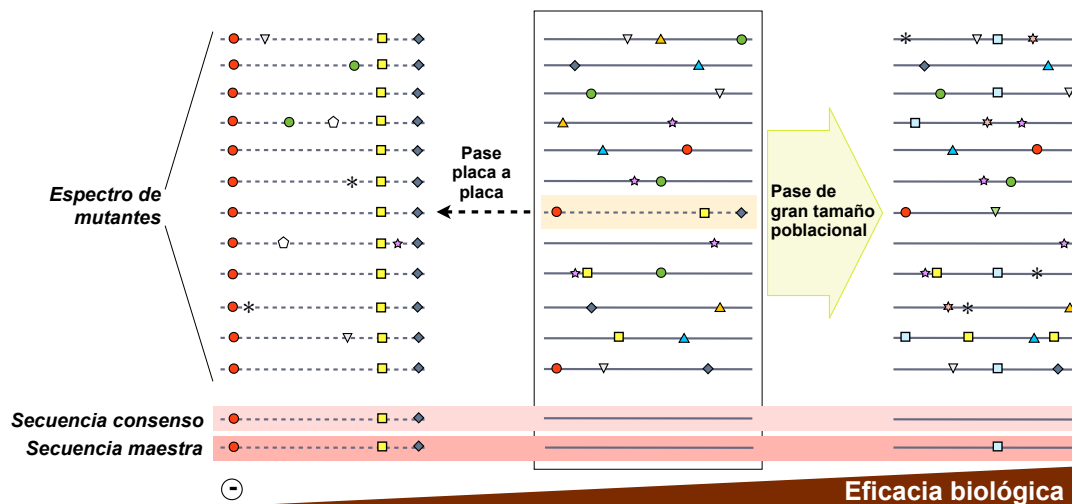


Figura 2.1 Esquema representativo de una cuasispecie y de la influencia del tamaño poblacional en la eficacia biológica. En el centro se representa un espectro de mutantes, donde cada línea se corresponde con un genoma y cada símbolo con una mutación. Al someter esta población a un cuello de botella poblacional (parte izquierda de la figura, líneas discontinuas), hay una pérdida de eficacia biológica. Esta desventaja es consecuencia de una disminución de la complejidad de la cuasispecie, con la fijación de mutaciones aleatorias que quedan reflejadas en la secuencia consenso de la población (línea situada debajo de cada distribución de genomas). Cuando la población replica con un gran tamaño poblacional en un ambiente constante, suele haber ganancia de eficacia biológica como consecuencia de un proceso de competición y selección, sin estar necesariamente reflejado en la secuencia consenso. La probabilidad de fijar mutaciones que aumenten la eficacia biológica del virus es también mayor en poblaciones grandes, con lo que la secuencia maestra puede diferir de la secuencia consenso.

2.2 Catástrofe de error y mutagénesis letal

Predicciones teóricas apoyadas por datos experimentales sugieren que las cuasispecies replican con unas tasas de error cercanas a un umbral de error (Figura 2.2) para el mantenimiento de la información genética de forma estable (Eigen, 2002; Eigen & Biebricher, 1988; Sierra *et al.*, 2000). El umbral de error depende del grado de adaptación de la población al ambiente en el que se encuentra y a la complejidad de la información contenida en el genoma. A la pérdida de infectividad por superación del umbral de error se le denomina extinción por entrada en catástrofe de error (Figura 2.2). Las poblaciones virales que replican con una fidelidad de copia por encima del umbral de error están sometidas a una selección negativa sin posibilidad de escape. Antes de alcanzar esta intensidad mutagénica, un menor número de mutaciones acumuladas en componentes de la cuasispecie puede dar lugar a genomas defectivos interferentes (GDI) (Martin *et al.*, 2010; Perales *et al.*, 2007). Los GDI que

mantienen su capacidad replicativa pueden interferir con el ciclo infectivo del resto de la cuasiespecie (Perales *et al.*, 2007). A la contribución de GDI en la extinción de virus se le denomina defeción letal (Grande-Pérez *et al.*, 2005b). Las bases moleculares de la extinción de virus por mutagénesis incrementada es un activo campo de investigación. En nuestro laboratorio, el modelo al que hemos llegado a partir de datos experimentales con varios virus RNA y un modelo teórico desarrollado por la Dra. Susanna Manrubia (CAB, CSIC-INTA) es que la extinción se produce en dos fases. Una primera fase está dominada por la defeción letal, cuando la intensidad mutagénica aplicada es baja o el agente mutagénico ha tenido un tiempo limitado de actuación. Una segunda fase ocurre con intensidades mutagénicas elevadas que dan lugar a un número creciente de mutaciones altamente deletéreas o letales (Grande-Pérez *et al.*, 2005b). Un estudio reciente con el VFA ha revelado que incluso los virus más viables durante un proceso de mutagénesis (capaces de plaquear y producir progenie clonal) sufren una bajada en su nivel de aptitud biológica (Arias *et al.*, 2013).

Se han empleado agentes mutagénicos específicos de virus para conducir a virus RNA a la extinción por entrada en catástrofe de error, principalmente análogos de

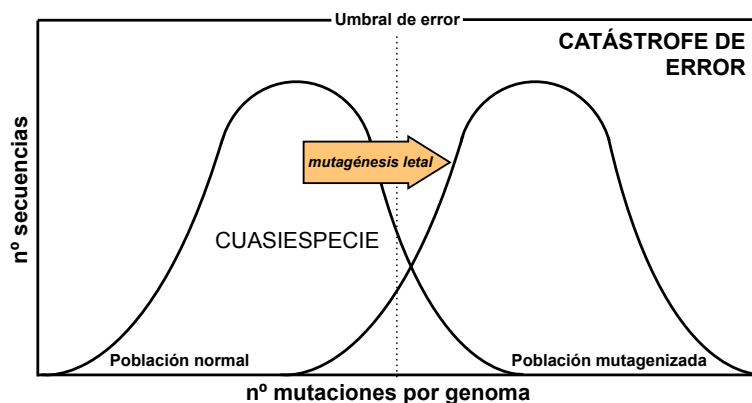


Figura 2.2 Esquema de la entrada en catástrofe de error por mutagénesis letal. El umbral de error está representado con una línea de puntos que marca la cantidad de mutaciones/secuencia que la población puede contener antes de dar lugar a una distribución de secuencias aleatorias (pérdida de información genética). El tratamiento con agentes mutagénicos conduce a la cuasiespecie más allá del umbral de error (mutagénesis letal) y la población entra en catástrofe de error. La entrada en catástrofe de error implica la aparición de genomas defectores (cuando la mutagénesis es menor) y de genomas letales (mutagénesis más intensa).

nucleótido (Grande-Pérez *et al.*, 2005b). A esta estrategia antiviral se le ha denominado mutagénesis letal (Loeb *et al.*, 1999). La transición hacia la extinción de virus por mutagénesis letal va acompañada de descensos de infectividad específica (el cociente entre la infectividad y la cantidad de RNA vírico) y de un aumento de la complejidad del espectro de mutantes, sin

necesariamente alterar la secuencia consenso de la cuasiespecie (Crotty *et al.*, 2001; Crotty *et al.*, 2000; González-López *et al.*, 2005; Grande-Pérez *et al.*, 2005a). El tratamiento con agentes mutagénicos puede dar lugar a la selección de mutaciones de

resistencia a análogos de nucleósido (Agudo *et al.*, 2010; Pfeiffer & Kirkegaard, 2003; Sierra *et al.*, 2007). Estas mutaciones pueden acabar imponiéndose en la secuencia consenso de la cuasiespecie, aumentando la eficacia biológica del virus en presencia del mutágeno. Uno de los objetivos principales de nuestro laboratorio es la aplicación de la mutagénesis letal al control de virus patógenos.

2.3 El virus de la fiebre aftosa

El VFA pertenece al género *Aphthovirus* de la familia *Picornaviridae*. Dentro de los picornavirus encontramos virus de importancia biomédica como el virus de la poliomielitis (PV), el virus de la hepatitis A o el virus del resfriado común. Como el resto de picornavirus, el VFA presenta un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de ~8 kb. El virión, de ~30 nm, tiene una cápsida de simetría icosaédrica compuesta de 60 protómeros y sin envuelta lipídica (Figura 2.3).

El VFA es el agente etiológico de la fiebre aftosa o glosopeda (Loeffler & Frosch, 1897). Fue descrita por primera vez en el siglo XVI y afecta a animales artiodáctilos o de pezuña hendida, que incluye animales importantes en ganadería. Se caracteriza por la aparición de lesiones vesiculares (aftas) en pezuñas, boca y ubres, acompañadas de fiebre y debilitación. La fiebre aftosa es altamente contagiosa y produce altas tasas de morbilidad (Brown, 2004; Rowlands, 2003), lo que causa grandes pérdidas económicas (Knowles *et al.*, 2001; OIE; Suttmoller *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 1999).

La alta variabilidad genética del VFA repercute en una gran diversidad antigénica que llevó a clasificar al VFA en 7 serotipos: A, O, C, Asia1, SAT1, SAT2 y SAT3, que a su vez se subdividen en numerosos subtipos y variantes (Mateu *et al.*, 1988). En nuestro laboratorio hemos empleado como virus de referencia un clon biológico aislado de cerdo en Santa Pau (Girona) en 1970 (Sobrino *et al.*, 1983). Dicho clon biológico se denomina C-S8c1 y pertenece al subtipo europeo C₁ dentro del serotipo C.

El genoma del VFA C-S8c1 tiene 8115 nucleótidos, sin contar los tramos homopoliméricos de policitidilato y poliadenilato, variables en longitud (Toja *et al.*, 1999). La región codificante comprende los nucleótidos 1039-8023 y posee un único

marco de lectura abierto que codifica una sola poliproteína. Flanqueando la región codificante se encuentran dos regiones no codificantes cuyas estructuras secundarias y terciarias componen elementos reguladores: la región 5'UTR, de 1038 nucleótidos con el poli(C) interno, y la región 3'UTR, de 91 nucleótidos más el poli(A) terminal (Figura 2.3).

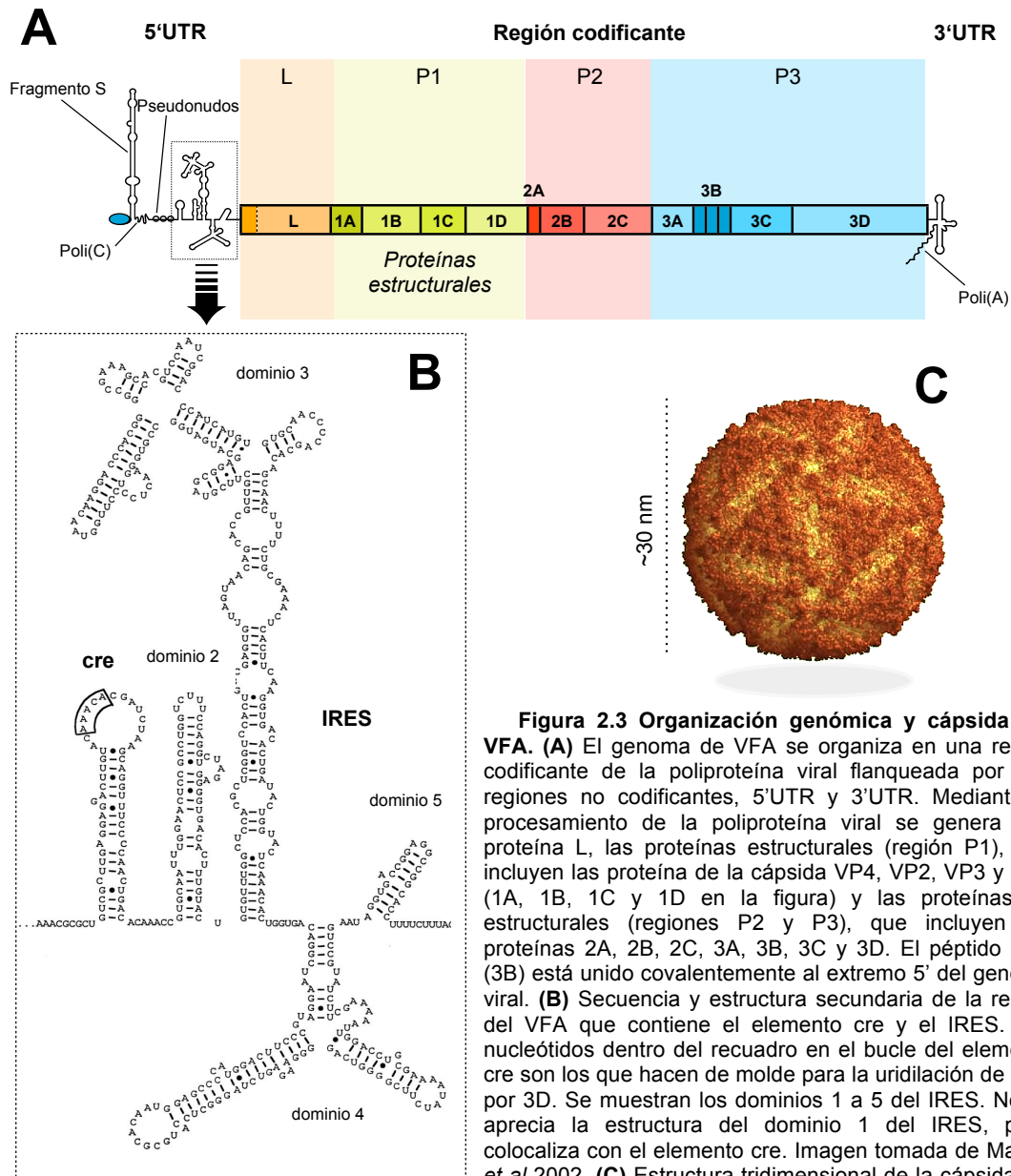


Figura 2.3 Organización genómica y cápsida del VFA. (A) El genoma de VFA se organiza en una región codificante de la poliproteína viral flanqueada por dos regiones no codificantes, 5'UTR y 3'UTR. Mediante el procesamiento de la poliproteína viral se genera una proteína L, las proteínas estructurales (región P1), que incluyen las proteínas de la cápsida VP4, VP2, VP3 y VP1 (1A, 1B, 1C y 1D en la figura) y las proteínas no estructurales (regiones P2 y P3), que incluyen las proteínas 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C y 3D. El péptido VPg (3B) está unido covalentemente al extremo 5' del genoma viral. (B) Secuencia y estructura secundaria de la región del VFA que contiene el elemento cre y el IRES. Los nucleótidos dentro del recuadro en el bucle del elemento cre son los que hacen de molde para la uridilación de VPg por 3D. Se muestran los dominios 1 a 5 del IRES. No se aprecia la estructura del dominio 1 del IRES, pues colocaliza con el elemento cre. Imagen tomada de Mason *et al* 2002. (C) Estructura tridimensional de la cápsida del VFA basada en datos cristalográficos (Acharya *et al.*, 1989) (Protein Data Bank: 1BBT).

2.4 La polimerasa de VFA

El RNA genómico del VFA es copiado por la proteína viral 3D, una polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRP). Al igual que otras polimerasas, la proteína 3D se pliega de tal forma que su estructura espacial recuerda a la forma de una mano derecha, con tres subdominios principales denominados *palm*, *fingers* y *thumb*. A diferencia de las polimerasas de DNA, las RdRP presentan un subdominio adicional conocido como *fingertips*. Este subdominio, localizado en el extremo N-terminal, ancla el subdominio *fingers* al subdominio *palm*, restringiendo la movilidad entre estos subdominios

[conformación de mano derecha cerrada (Ferrer-Orta *et al.*, 2009; Ferrer-Orta *et al.*, 2004)].

La estructura tridimensional de 3D, tanto aislada como unida a una molécula de RNA molde-iniciador (Figuras 2.4 y 2.5 respectivamente), se resolvió en el laboratorio de la Dra. Nuria Verdaguer (IBMB, CSIC) en colaboración con nuestro grupo (Ferrer-Orta *et al.*, 2004). En dicha estructura se pueden distinguir los siguientes subdominios y motivos:

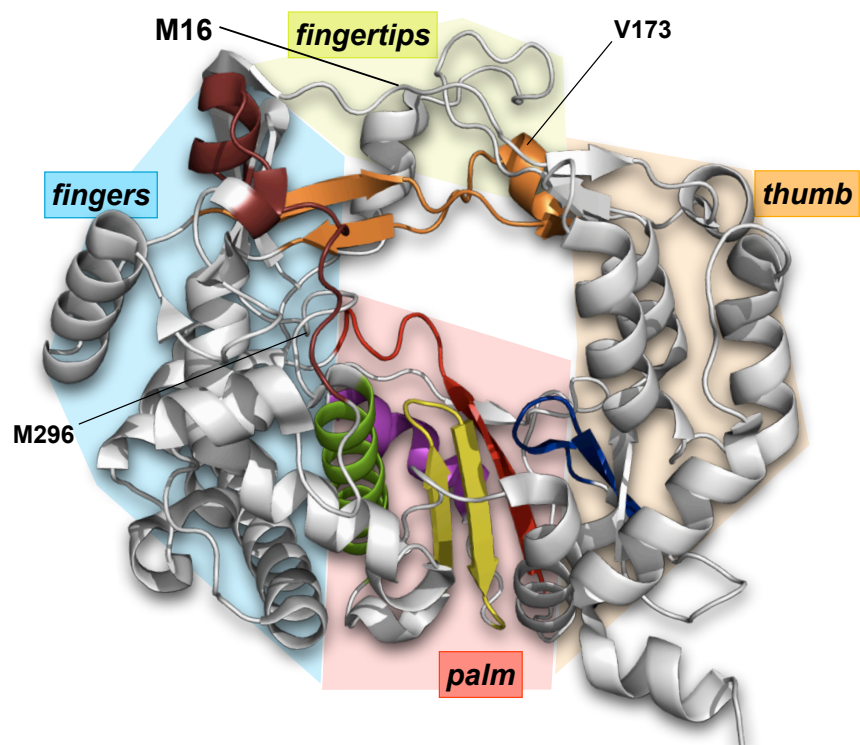
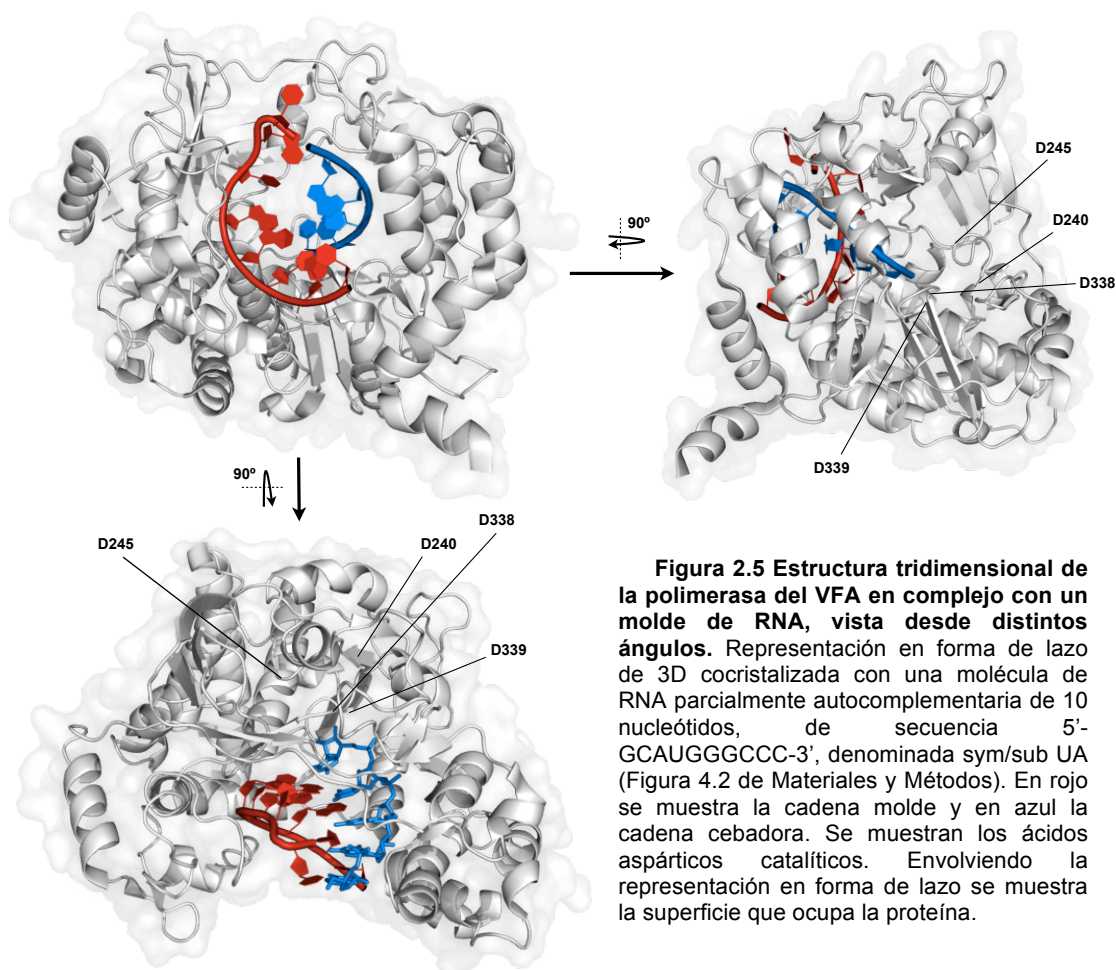


Figura 2.4 Estructura tridimensional de la polimerasa del VFA en ausencia de molde. Representación en forma de lazos en la que se puede observar la estructura en mano derecha típica de las polimerasas de ácidos nucleicos. Se pueden diferenciar los subdominio *palm*, *fingers*, *thumb* y *fingertips*. Los motivos funcionales de la polimerasa también se muestran en colores: motivo A (rojo), motivo B (verde), motivo C (amarillo), motivo D (púrpura), motivo E (azul), motivo F (naranja) y motivo G (marrón). PDB: 1UO9.

Subdominio *fingertips*: Compuesto por los residuos del 1 al 57. No contiene ningún motivo funcional descrito, pero los residuos R17 y K20 interactúan con RNA

(Figura 2.6). Esta zona incluye una señal de localización nuclear (NLS) (Sanchez-Aparicio *et al.*, 2013) y ha sido objeto de estudio en la presente tesis doctoral por su posible implicación en el reconocimiento de nucleótidos (apartado 5.3 de Resultados).

Subdominio *fingers*: Compuesto por los residuos 58-207 y 249-302, contiene el motivo F (residuos 159-183) implicado en unión al nucleótido, y el motivo G (residuos 110-128) que está en la zona de entrada del molde (Gorbalenya *et al.*, 2002). El motivo F forma un túnel cargado positivamente, y en él se han mapeado las sustituciones de resistencia a análogos de nucleótido P169S y V173I, caracterizadas en esta tesis doctoral. Adicionalmente, al motivo F se le ha atribuido una posible implicación en separación de hebras complementarias de RNA (Bruenn, 2003).



Subdominio *palm*: Compuesto por los residuos 208-248 y 303-343. En este subdominio se encuentra el centro catalítico de todas las polimerasas de ácidos nucleicos, que en el caso de la proteína 3D del VFA incluye los residuos D338, D339

(motivo C) y D245 (motivo A) (Figuras 2.5 y 2.6). En el subdominio *palm* se encuentran los motivos conservados A, B, C, D y E (Bruenn, 2003; Chen & Wang, 2002; Ferrer-Orta *et al.*, 2006b; Ferrer-Orta *et al.*, 2004; Gorbalenya *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 1997).

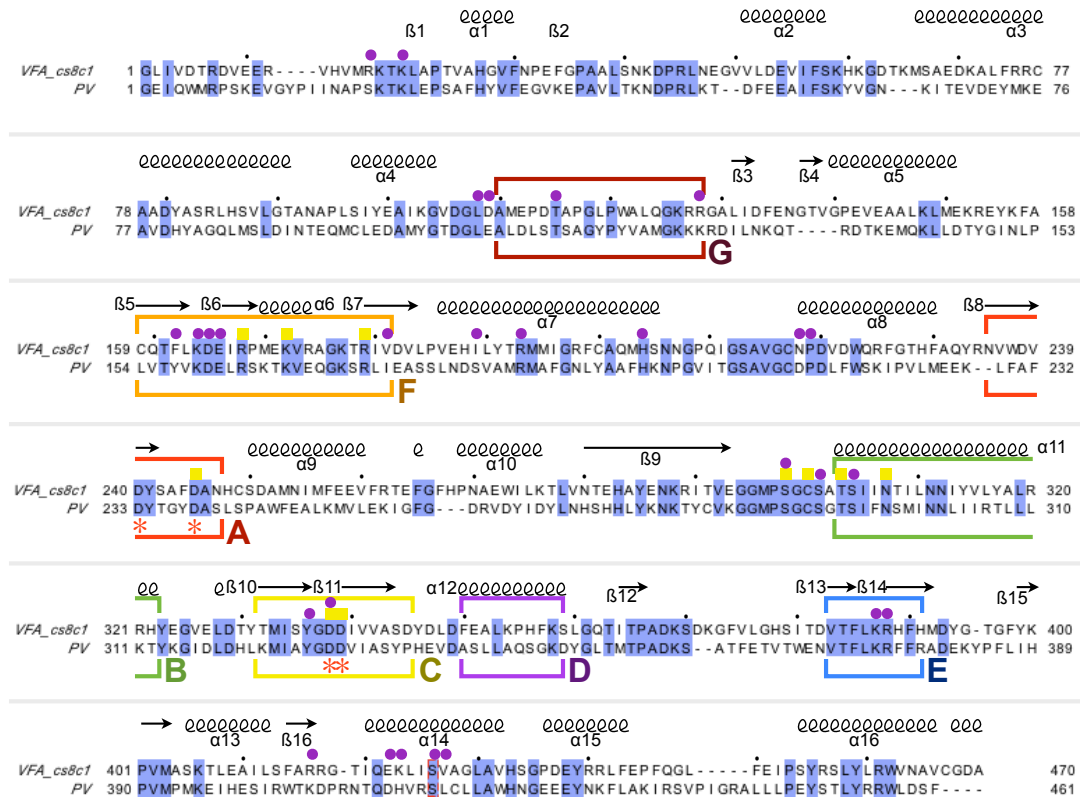


Figura 2.6 Alineamiento de la secuencia aminoacídica de 3D del VFA frente a PV. Alineamiento realizado con el servidor informático ClustalW2 entre la secuencia de aminoácidos de la proteína 3D de poliovirus y la secuencia de 3D del VFA empleada en nuestro laboratorio. Los residuos idénticos entre ambas secuencias se muestran en cajas azules. Se indican las estructuras secundarias de 3D del VFA, así como los motivos funcionales conservados A, B, C, D, E, F y G, que se muestran con los mismo colores de la figura 2.4. Además se muestran los residuos de aspártico catalíticos (asteriscos rojos), residuos que interaccionan con el RNA (círculos púrpuras) y residuos que interaccionan con el NTP (cuadrados amarillos) (Ferrer-Orta *et al.*, 2004).

Los motivos A y B juegan un papel de unión y reconocimiento del nucleótido entrante; el motivo C fundamentalmente lleva a cabo la catálisis de la transferencia nucleotídica; el motivo D conforma un bucle flexible que, no solo mantiene los motivos A y B en una posición adecuada, sino que además contiene en el residuo 353 una lisina que protona el grupo pirofosfato liberado durante la reacción de transferencia nucleotídica, acelerando la catálisis (Castro *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012); el motivo E es importante para la fijación del cebador de RNA. Cabe mencionar el bucle β9-α11, que

precede al motivo B, dado que su flexibilidad juega un papel importante en el reconocimiento de nucleótidos y en el correcto posicionamiento del azúcar en el bolsillo de unión a ribosa (Ferrer-Orta *et al.*, 2007; Ferrer-Orta *et al.*, 2010). En este bucle mapea la mutación de resistencia a ribavirina M296I (Sierra *et al.*, 2007).

Subdominio *thumb*: Comprende los residuos 404-470. Es la región más diversa en las RdRP de estructura conocida (Lescar & Canard, 2009) (ver también figura 2.6).

Inicio de la replicación

El inicio de la replicación del RNA del VFA tiene lugar con la uridilación del péptido VPg por parte de la proteína 3D. Durante este proceso, el péptido VPg ocupa la cavidad central de la polimerasa y actúa como cebador para la adición sucesiva de dos moléculas de UMP sobre la Tyr-3 de VPg (Figura 2.7). La Tyr-3 estaría posicionada de tal manera que imita al 3'-hidroxilo libre de un cebador en el centro activo de 3D, de tal forma que se ha observado al grupo hidroxilo de Tyr-3 unido covalentemente al fosfato α de la molécula de UMP (Ferrer-Orta *et al.*, 2006a).

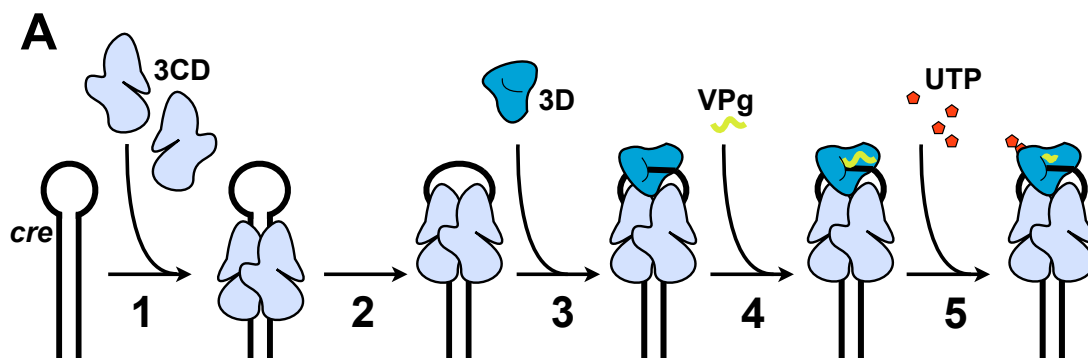
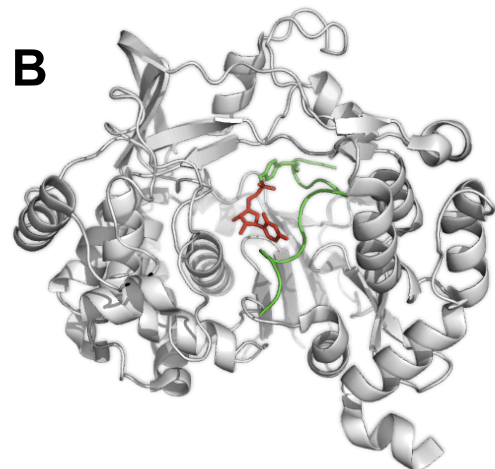


Figura 2.7 Uridilación de VPg. (A) Modelo del inicio de la replicación en poliovirus: 2 moléculas de 3C o 3CD se unen al elemento cre. La isomerización del complejo permite que se abra la horquilla, quedando expuesta la región que sirve de molde para la uridilación. La unión de 3D al complejo es facilitada por las interacciones con 3CD (o 3C). El péptido VPg se une a 3D por el canal de entrada del RNA. En presencia de UTP, el grupo hidroxilo del residuo Tyr-3 de VPg se uridila. Un mecanismo de deslizamiento (*slide-back*) hace que la VPg monouridilada (VPg-pU) pueda volver a uridilarse. El complejo replicativo es translocado al poli(A) de 3' para comenzar el copiado del genoma de PV (basado en Pathak *et al.*, 2007). **(B)** Estructura tridimensional de la polimerasa del VFA en complejo con el péptido VPg (verde), covalentemente unido a través del aminoácido Tyr-3 (la cadena lateral ha sido representada) a una molécula de UMP (rojo). PDB: 2F8E (Ferrer-Orta *et al.*, 2006a). El mecanismo de uridilación de VPg en VFA parece similar al de PV.

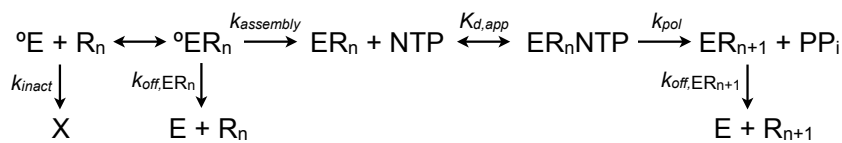


Como molde de dicha reacción, 3D emplea el bucle del elemento cre, situado en el 5'UTR del VFA (Figura 2.3) y la reacción de uridilación es estimulada por la proteína 3CD (Nayak *et al.*, 2005). Tras el copiado del RNA genómico, el péptido VPg permanece covalentemente unido al extremo 5' del RNA.

Elongación de RNA

La elongación del RNA viral por la polimerasa consiste en una sucesión de reacciones de transferencia nucleotídica mediadas por un ataque nucleofílico del fosfato α del nucleótido entrante (NTP) por parte del 3'-OH del extremo del cebador. Así, se forma un nuevo enlace fosfodiéster, con la consiguiente liberación de un grupo pirofosfato.

El primer paso de un mecanismo cinético mínimo para la adición de un nucleótido por parte de la proteína 3D del VFA sería la unión de la enzima libre $^{\circ}E$ al RNA (R_n), para formar el complejo $^{\circ}ER_n$, que pasa a activarse lentamente (ER_n) y está definido por la $k_{assembly}$. $^{\circ}E$ puede ser inactivada térmicamente (X) a una velocidad dada por k_{inact} . Una vez está formado el complejo 3D-RNA activo, tiene lugar la entrada de un nucleótido. La constante de afinidad de la polimerasa por dicho nucleótido $K_{d,app}$ condicionará la unión del nucleótido en el centro activo de la polimerasa para su posterior incorporación al cebador de RNA. La constante k_{pol} gobierna la catálisis de la transferencia nucleotídica y liberación del grupo pirofosfato (PP_i). El complejo de elongación puede disociarse a una velocidad dada por k_{off} . Los principales productos intermedios y constantes cinéticas relevantes pueden representarse del siguiente modo (Arias *et al.*, 2008):



Las RdRPs víricas se caracterizan por presentar fidelidad de copia baja. La fidelidad de copia viene determinada por la proporción de incorporaciones correctas que una polimerasa puede introducir durante la replicación de un ácido nucleico: cuanto más fiel es una enzima, menor número de errores comete por nucleótido copiado. Una mínima fidelidad de copia es necesaria para mantener información genética durante generaciones sucesivas. Sin embargo, un aumento de la tasa de mutación permite un aumento de la diversidad genética que favorece la adaptabilidad.

Se ha observado una correlación entre la longitud del genoma y la tasa de mutación (Gago *et al.*, 2009).

Los virus RNA presentan tasas de mutación elevadas (10^{-3} - 10^{-5} errores por nucleótido copiado), órdenes de magnitud por encima de las que tienen lugar durante la replicación del DNA de organismos superiores (10^{-8} - 10^{-11} errores por nucleótido copiado) (Domingo *et al.*, 2012; Friedberg *et al.*, 2006). La alta tasa de mutación permite a las poblaciones de virus RNA adoptar estructura de cuasiespecies virales (apartado 2.1). La baja fidelidad de copia de las polimerasas de virus RNA se debe en parte a la ausencia de actividad exonucleasa 3'→5' correctora de errores (Steinhauer *et al.*, 1992). No obstante, actividades exonucleasa de RdRP sobre nucleótidos incorporados de forma incorrecta han sido descritas para coronavirus (Bouvet *et al.*, 2012; Denison *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2013) y para HCV (Jin *et al.*, 2013).

2.5 Proteína 2C

La proteína 2C es multifuncional, aunque su papel principal en el ciclo infectivo de picornavirus aún no está claro. Alineamientos de secuencia colocan a la proteína 2C dentro de la familia 3 de helicasas pertenecientes a la superfamilia de ATPasas AAA+ (Gorbalenya & Koonin, 1988; Gorbalenya *et al.*, 1988; Gorbalenya *et al.*, 1990). Esta clasificación se debe a la presencia de los motivos conservados Walker A y Walker B, característicos de enzimas que unen e hidrolizan NTPs, y al motivo C, típico de las proteínas AAA+ (ATPasas asociadas con varias actividades celulares) de la superfamilia 3 de helicasas (Walker *et al.*, 1982).

El motivo Walker A (GXXXXGKS, donde X puede ser cualquier aminoácido, siendo en 2C del VFA ₁₁₀GKSGQGKS₁₁₇; Figura 2.8), está implicado en la unión del nucleótido de purina a través de los grupos fosfato. El motivo Walker B se define por 2 residuos de ácido aspártico (o D) precedidos por un tramo de aminoácidos hidrofóbicos (₁₅₆VVVMDD₁₆₁ en el VFA; Figura 2.8) y se une al átomo de Mg²⁺ necesario para catalizar la escisión del fosfato-γ del NTP (Gorbalenya *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 1982). El motivo C se caracteriza por un residuo de asparragina (N) al final de un tramo de residuos hidrofóbicos (₂₀₂IIATTN₂₀₇ en el VFA; Figura 2.8).



Figura 2.8 Alineamiento de la secuencia aminoacídica de 2C de VFA Cs8c1 y PV. Alineamiento realizado con el servidor informático ClustalW2. Los residuos idénticos entre ambas secuencias se muestran en cajas azules. Se indican los motivos conservados en 2C de picornavirus: A, B y C.

Además de estos motivos conservados se han identificado regiones capaces de interactuar con RNA, localizadas en los extremos N- y C- terminal (Rodríguez & Carrasco, 1995) (Figura 2.9.A) y se ha demostrado la unión de la 2C al RNA (Bienz *et al.*, 1990; Rodríguez & Carrasco, 1993).

Según predicciones de la estructura de 2C el extremo N-terminal conformaría una hélice anfipática implicada en unión a membranas (Figura 2.9.A) (Echeverri *et al.*, 1998; Echeverri & Dasgupta, 1995; Paul *et al.*, 1994; Teterina *et al.*, 1997). 2C forma oligómeros de 6 unidades con simetría hexagonal característicos de las ATPasa AAA+ (Adams *et al.*, 2009; Papageorgiou *et al.*, 2010; Sweeney *et al.*, 2010) (Figura 2.9.B). Para la hexamerización de 2C del VFA es necesaria la presencia de ATP y RNA. La actividad ATPasa de 2C depende de un mecanismo coordinado entre los monómeros del hexámero (Sweeney *et al.*, 2010).

Se han demostrado varios papeles de 2C y de su precursor 2BC en la replicación del RNA. Interaccionan con 3AB (Yin *et al.*, 2007), 3C (Banerjee *et al.*, 2004) y con el extremo 3' del RNA viral (Banerjee & Dasgupta, 2001). 2C es necesaria para la uridilación de VPg (Lyons *et al.*, 2001), interacciona con la beclina1, un regulador celular de la ruta autofágica, que afecta a la eficacia de la replicación del VFA (Gladue *et al.*, 2012), y participa en encapsidación (Vance *et al.*, 1997; Verlinden *et al.*, 2000) y desencapsidación del virión (Li & Baltimore, 1990).

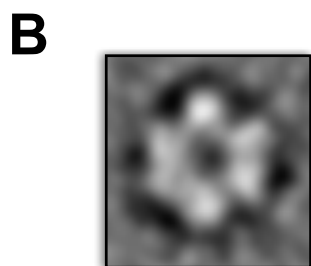
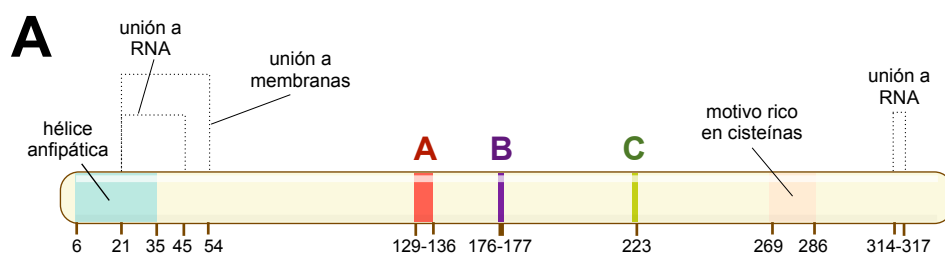


Figura 2.9 Organización de la proteína 2C de poliovirus y micrografía de un hexámero de 2C del VFA. (A) Se representan los dominios funcionales que han sido descritos para la proteína 2C de PV y los motivos conservados entre los miembros de la superfamilia 3 de helicasas. Los números indican la posición de los aminoácidos relevantes. (B) Imagen obtenida con microscopio electrónico de la proteína 2C del VFA, expresada sin la hélice anfipática del N-terminal y que contiene la sustitución N207A. La 2C se encuentra formando anillos hexaméricos en presencia de ATP y RNA. Imagen tomada de Sweeney et al. 2010.

2C tiene actividad ATPasa y GTPasa *in vitro*, tal y como predicen los motivos funcionales (Klein *et al.*, 1999; Mirzayan & Wimmer, 1994; Pfister & Wimmer, 1999; Rodriguez & Carrasco, 1993; Samuilova *et al.*, 2006; Sweeney *et al.*, 2010). Dicha actividad requiere la oligomerización de la proteína 2C (Adams *et al.*, 2009; Sweeney *et al.*, 2010) y su función es desconocida.

A pesar de que la proteína 2C está enmarcada dentro de la superfamilia 3 de las helicasas, no se ha demostrado hasta la fecha esta actividad para ningún miembro de la familia *Picornaviridae*. Sin embargo, recientemente se ha descrito para la proteína 2C del virus de *Ectropis Oblicua* (EoV; género *Iflaviridae*, orden *Picornavirales*) un mecanismo independiente de hidrólisis de ATP de separación de las hebras del RNA de doble banda (Cheng *et al.*, 2013). En la presente tesis doctoral se describe un proceso de separación de doble banda de DNA que no necesita de hidrólisis de ATP. Este mecanismo, que coincidiría con el de una chaperona de ácidos nucleicos, es similar al descrito para la 2C del virus de *Ectropis Oblicua*.

Tras la infección por picornavirus se produce una reorganización de las membranas celulares que facilitan el ensamblaje de la maquinaria de replicación del virus y permite la protección del RNA viral (Miller & Krijnse-Locker, 2008). La proteína 2C gracias a una hélice anfipática en su extremo N-terminal, es capaz de unirse a membranas y contribuir a formar el complejo de replicación (Bienz *et al.*, 1990; Kirkegaard & Semler, 2010). La presencia de la hélice anfipática en 2C supone un problema de solubilidad durante la purificación de la proteína. Sweeney y

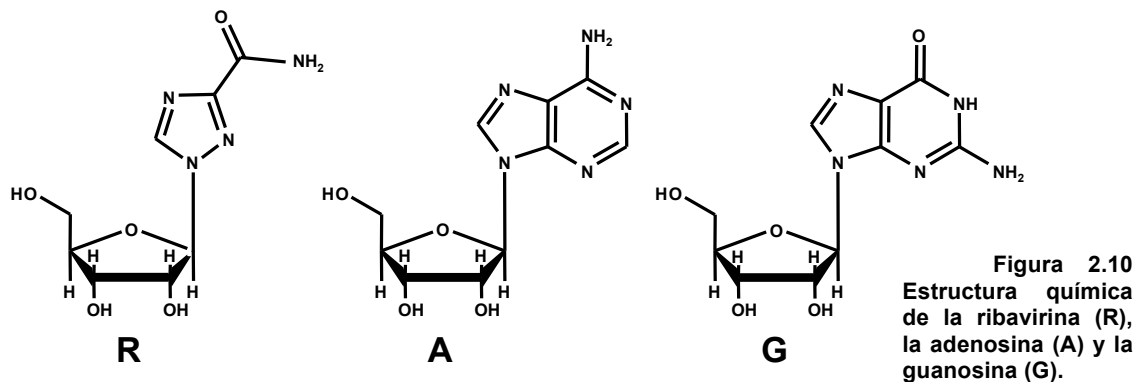
colaboradores (2010) deleccionaron los primeros 33 residuos de la proteína 2C del VFA correspondientes a dicha hélice. La proteína truncada incrementó considerablemente su solubilidad sin perder su actividad ATPasa y manteniendo la formación de hexámeros. Este abordaje fue repetido en nuestro laboratorio tal y como se describe en el apartado 4.17.2.

Distintas mutaciones en la proteína 2C han sido seleccionadas tras el tratamiento con inhibidores de la replicación, como cloruro de guanidinio (GuH) (Baltera & Tershak, 1989; Barton & Flanagan, 1997; Belsham & Normann, 2008; de la Torre *et al.*, 1990; Pariente *et al.*, 2003; Pincus *et al.*, 1986; Pincus & Wimmer, 1986; Saunders & King, 1982; Saunders *et al.*, 1985; Teterina *et al.*, 2001), a benzoimidazol o a ambos compuestos (De Palma *et al.*, 2008; Hadaschik *et al.*, 1999; Klein *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 2000).

En nuestro laboratorio se seleccionó la mutación I248T en 2C tras el tratamiento continuado con ribavirina del mutante SSI (un mutante triple con las sustituciones P44S, P169S y M296I en 3D que resiste a la acción mutagénica de la ribavirina; ver apartado 2.6). Dicha mutación, seleccionada anteriormente en poblaciones del VFA tratadas con GuH (Pariente *et al.*, 2003) y virus adaptados a ratón (Sanz-Ramos *et al.*, 2008), es capaz de modular los tipos de transiciones introducidas por la proteína 3D. Esta distribución más balanceada de los tipos de transiciones permitió al VFA sobrevivir al efecto mutagénico de altas concentraciones de ribavirina, a pesar de que la tasa de mutación en estas condiciones era elevada (Agudo *et al.*, manuscrito en preparación).

2.6 Ribavirina

La ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida) es un análogo de purinas con acción antiviral de amplio espectro (Figura 2.10) y aprobada para su uso en humanos. En la actualidad, la ribavirina se emplea para el tratamiento de infecciones del virus de la hepatitis C [en combinación con interferón-α o su derivado pegilado (Cummings *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 1998; McHutchison *et al.*, 1998)], del virus respiratorio sincitial (Cooper *et al.*, 2003) y del virus Lassa (Bausch *et al.*, 2010).



La ribavirina es administrada como nucleósido, pero una serie de reacciones intracelulares de fosforilación la convierten en el nucleósido trifosfato (RTP) que sirve como sustrato para la polimerasa del virus (Figura 2.11). La adenosina kinasa fosforila la ribavirina para convertirla en ribavirina-5'-monofosfato (RMP) (Willis *et al.*, 1978), aunque otras enzimas pueden también estar implicadas (Wu *et al.*, 2005). La RMP es un inhibidor de la inosín monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) (Balzarini *et al.*, 1993; Lowe *et al.*, 1977). Reacciones sucesivas catalizadas por nucleósido mono y bifosfato kinasas dan lugar a ribavirina-5'-trifosfato (Gallois-Montbrun *et al.*, 2003). Pocas horas después del tratamiento con concentraciones de ribavirina equivalentes a dosis farmacológicas relevantes (10-100 μM) los valores de RTP intracelular alcanzan concentraciones similares a las de ATP y GTP en condiciones fisiológicas ($>100 \mu\text{M}$) (Page & Connor, 1990).

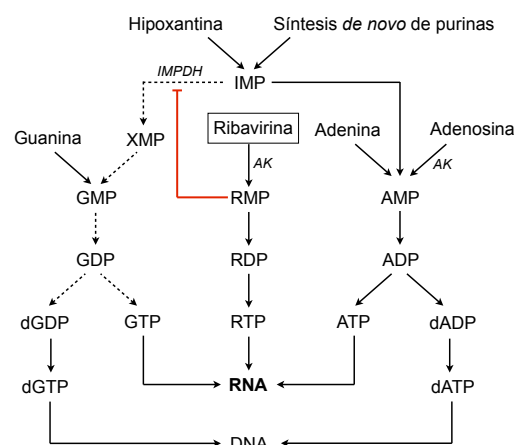


Figura 2.11 Metabolismo de la ribavirina. La ribavirina es fosforilada por la adenosina kinasa (AK) y mediante dos fosforilaciones más, se convierte en ribavirina trifosfato (RTP), que puede ser incorporada en el RNA. La forma monofosfato de la ribavirina (RMP) inhibe la inosín monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), reduciendo la cantidad de GTP (líneas discontinuas).

La actividad antiviral de la ribavirina fue documentada por primera vez en 1973 (Streeter *et al.*, 1973). Desde entonces se ha observado efecto antiviral ante un gran número de virus [revisado en (Graci & Cameron, 2006)]. Se han identificado distintos mecanismos implicados en la acción de ribavirina frente a virus RNA.

El primer mecanismo antiviral propuesto para la ribavirina fue la inhibición de la inosín monofosfato deshidrogenasa (Streeter *et al.*, 1973). La ribavirina monofosfato

compite con el inosín monofosfato, sustrato natural de la IMPDH (Figura 2.11), generando reducciones de hasta 5 veces en los niveles de GTP intracelular (Balzarini *et al.*, 1993; Lowe *et al.*, 1977; Sintchak & Nimmesgern, 2000; Zimmerman & Deeprase, 1978). El desbalance en los niveles de nucleótidos ocasionado por RMP afectan a la síntesis de RNA. Adicionalmente, el descenso de GTP intracelular puede favorecer la incorporación de nucleótidos erróneos en lugar de GMP durante los procesos replicativos e inducir el uso de RTP como sustrato anómalo (Airaksinen *et al.*, 2003; Stuyver *et al.*, 2002).

Además de un posible efecto mutagénico por desbalance en los niveles de nucleótidos intracelulares, la ribavirina, en su forma nucleotídica, puede ser incorporada durante la síntesis del RNA por polimerasas víricas (Crotty *et al.*, 2001; Crotty *et al.*, 2000; Day *et al.*, 2005; Freistadt *et al.*, 2004; Lanford *et al.*, 2001; Severson *et al.*, 2003; Sierra *et al.*, 2007). Dado que su estructura mimetiza tanto la adenosina como la guanosina, la RMP puede ser incorporada en vez de AMP o GMP, dando lugar a un aumento de la frecuencia de mutación del virus (Figura 2.12) (Agudo *et al.*, 2010; Airaksinen *et al.*, 2003; Ortega-Prieto *et al.*, 2013; Sierra *et al.*, 2007).

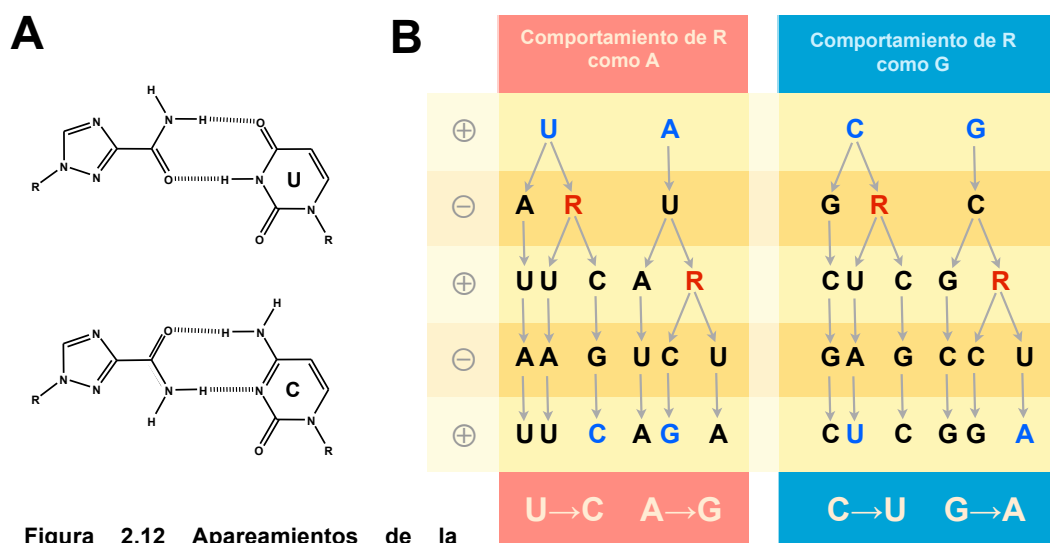


Figura 2.12 Apareamientos de la ribavirina. (A) La ribavirina puede adoptar dos configuraciones por rotación del grupo carboxamida, que permite el establecimiento de puentes de hidrógeno tanto con U como con C. **(B)** Esquema de las mutaciones que pueden aparecer en el RNA viral como consecuencia de los apareamientos que se observan en (A). A la izquierda se indica la hebra de RNA en la que se encuentra cada nucleótido. En la parte inferior se indican los tipos de mutaciones que en cada caso pueden tener lugar.

A pesar de su comportamiento potencial como A o G, con los virus estudiados en nuestro laboratorio (VFA, LCMV y HCV), hemos observado que la ribavirina provoca preferentemente un aumento de las transiciones C→U y G→A

(Agudo *et al.*, 2010; Moreno *et al.*, 2011; Ortega-Prieto *et al.*, 2013; Sierra *et al.*, 2007), sugiriendo que la ribavirina se comporta preferentemente como G. No obstante, en estudios *in vitro* la ribavirina se incorpora con eficacia similar frente a C y frente a U (Arias *et al.*, 2008). Las razones de esta discrepancia no están claras. La alteración del patrón de transiciones causado por este sesgo mutacional en presencia de ribavirina es detrimental para el virus, como sugiere la aparición de mutaciones de resistencia a ribavirina encargadas de restablecer el patrón mutacional sin variación de la frecuencia de mutación de los espectros de mutantes generados (Agudo *et al.*, 2010).

Los virus pueden disminuir su sensibilidad a la acción mutagénica de la ribavirina mediante distintos mecanismos: el aumento de la tasa de mutación causado por la ribavirina puede ser compensado con un aumento generalizado de la fidelidad de copia de la polimerasa vírica (Pfeiffer & Kirkegaard, 2003; 2005; Sadeghipour *et al.*, 2013; Vignuzzi *et al.*, 2006); puede haber un impedimento específico de la incorporación de ribavirina monofosfato en el RNA viral (Arias *et al.*, 2008; Ferrer-Orta *et al.*, 2010; Sierra *et al.*, 2007); o puede haber una modulación del patrón de transiciones, como la que tiene lugar cuando el VFA con las sustituciones P44S, P169S y M296I en 3D (mutante SSI) es pasado en presencia de R (Agudo *et al.*, 2010).

Otros efectos antivirales descritos para la ribavirina son la inhibición del *capping* (Benarroch *et al.*, 2004; Bougie & Bisaillon, 2004; Goswami *et al.*, 1979; Wray *et al.*, 1985a; Zhou *et al.*, 2003), la inhibición de polimerasas virales (Cassidy & Patterson, 1989; Fernandez-Larsson & Patterson, 1990; Lanford *et al.*, 2001; Maag *et al.*, 2001; Rankin *et al.*, 1989; Stuyver *et al.*, 2002; Toltzis *et al.*, 1988; Wray *et al.*, 1985b) y un efecto inmunomodulador (Hultgren *et al.*, 1998; Ning *et al.*, 1998).

2.7 5-Fluorouracilo

El 5-fluorouracilo (FU) (Figura 2.13) se sintetizó por primera vez en 1957 para terapia antitumoral (Heidelberger *et al.*, 1957; Rutman *et al.*, 1954). Originalmente se diseñó para ser inhibidor irreversible de la timidilato sintasa (TS), que cataliza la conversión de desoxiuridina monofosfato (dUMP) a desoxitimina monofosfato (Santi *et al.*, 1974). En la actualidad se sigue utilizando el 5-fluorouracilo en terapia antitumoral,

solo o en combinación con otros fármacos (Begue & Bonnet-Delpon, 2008; Joensuu & Gligorov, 2012; Melichar *et al.*, 2012).

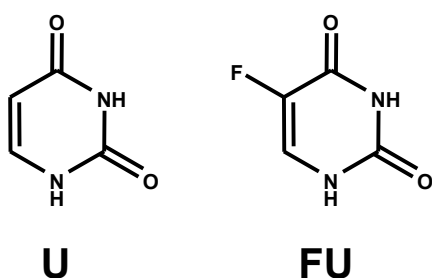


Figura 2.13 Estructura química del uracilo y del 5-fluorouracilo.

La similitud entre FU y U permite al análogo hacer uso de las mismas vías de entrada a la célula y acceder a los circuitos metabólicos en los que participa el uracilo (Figura 2.14). La mayor parte de FU se transforma en 5-fluorouridina-5'-monofosfato (FUMP) a partir de ororato por la ororato fosforribosiltransferasa (OPRT) utilizando fosforribosil pirofosfato como cofactor (PRPP), o indirectamente vía 5-fluorouridina (FUr) a través de la acción secuencial de uridín fosforilasa (UP) y uridina kinasa (UK) (Longley *et al.*, 2003). El FUMP puede ser fosforilado por las nucleósido kinasas a 5-fluorouridina trifosfato (FUTP), o convertido a 5-fluorodesoxiuridina-5'-difosfato (FdUDP). El FdUDP puede ser fosforilado o defosforilado para dar lugar a 5-fluorodesoxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP) o FdUMP.

FUTP y FdUTP pueden actuar como sustratos de polimerasas de ácidos nucleicos (Dragun *et al.*, 1990; Ferrer-Orta *et al.*, 2007; Gordon & Staehelin, 1959; Munyon & Salzman, 1962). La presencia de FU en el RNA inhibe la maduración de RNA ribosómico (Ghoshal & Jacob, 1997; Kanamaru *et al.*, 1986) y de transferencia (Randerath *et al.*, 1983; Santi & Hardy, 1987) y altera el procesamiento y la estructura secundaria de los precursores de mensajeros de RNA (Carrico & Glazer, 1979; Dolnick & Wu, 1993; Doong & Dolnick, 1988; Lenz *et al.*, 1994; Patton, 1993; Samuelsson, 1991).

Durante la replicación viral, FU puede ser incorporado en el DNA o RNA viral (Dragun *et al.*, 1990; Gordon & Staehelin, 1959; Munyon & Salzman, 1962), causando un aumento en la frecuencia de mutación por apareamiento incorrecto de bases (Figura 2.15 y 2.16) (Agudo *et al.*, 2009). También se ha observado que la presencia de halogenoderivados del uracilo provocan un

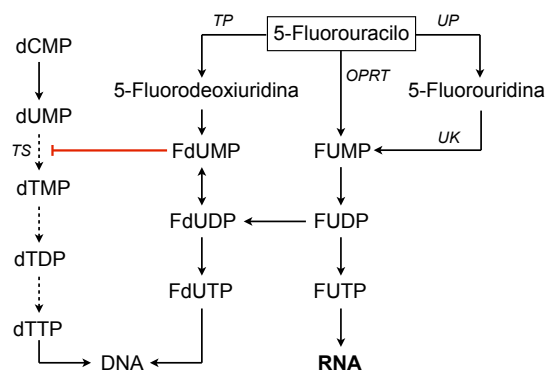


Figura 2.14 Metabolismo del fluorouracilo. La fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP) es inhibidor de la timidilato sintasa (TS), impidiendo la conversión de dUMP a dTMP. Las líneas discontinuas representan las reacciones que se ven afectadas por el efecto inhibitorio de derivados del 5-fluorouracilo. (Esquema basado en Longley *et al.* 2003).

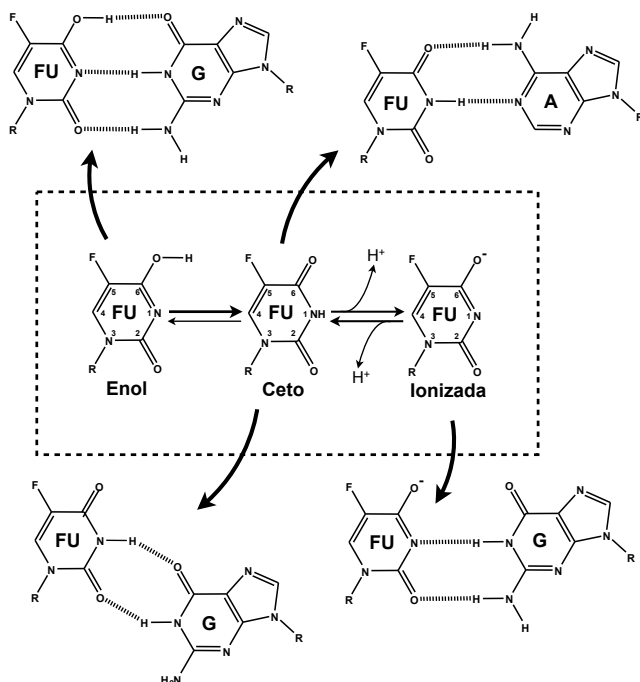


Figura 2.15 Apareamientos del fluorouracilo. Se muestran los posibles apareamientos entre FU y A o G. El apareamiento con la A es de tipo Watson-Crick. El apareamiento con G puede darse de distintas formas, ya que la electronegatividad del flúor altera la densidad electrónica del anillo de pirimidina. La pérdida de un electrón en la posición N1 da lugar a una forma enólica, teniendo lugar un apareamiento Watson-Crick. La forma cetónica permite un apareamiento “tambaleante” (o *wobble*) con G. La ionización de FU también permite un apareamiento Watson-Crick (basado en Yu *et al.*, 1993).

aumento de mutaciones por alteraciones en los niveles normales de dNTPs (Hopkins & Goodman, 1980).

Al tratar células BHK-21 con FU se produce FUTP a la vez que se reducen los niveles de UTP, sin alterar los niveles de GTP, ATP y CTP intracelulares (Pariente *et al.*, 2003). Al ser incorporado en mayor medida como U que como C, se acumulan transiciones U→C y A→G, un sesgo mutacional observado para el VFA (Pariente *et al.*, 2001; Sierra *et al.*, 2000) y LCMV (Grande-Pérez *et al.*, 2002).

La adición de uridina sobre el péptido VPg por parte de la proteína 3D constituye el paso inicial de la replicación del VFA (ver el apartado 2.4). La presencia de FUTP provoca la unión covalente de FUMP al sitio de unión al UMP, inhibiendo competitivamente la reacción de uridilación (Agudo *et al.*, 2008). Por tanto, el FU tiene una actividad dual frente al VFA: inhibición de la iniciación de la replicación del RNA e incorporación al RNA viral durante su síntesis, lo que origina una actividad mutagénica.

Hasta la fecha se han descrito dos mutaciones de resistencia a FU en el fago ΦX174 que no afectan a la polimerasa (Domingo-Calap *et al.*, 2012) y una sustitución (R84H) en la 3D del VFA pasado en presencia de FU que provoca un aumento de fidelidad replicativa (Zeng *et al.*, 2013). También se han descrito mutaciones en el fago Qβ que confieren resistencia a la acción mutagénica de 5-azacitidina (AZC), otro análogo de pirimidinas (Arribas *et al.*, 2012). En la presente memoria se describe una

sustitución en la polimerasa del virus de la fiebre aftosa capaz de modular la acción mutagénica del 5-fluorouracilo.

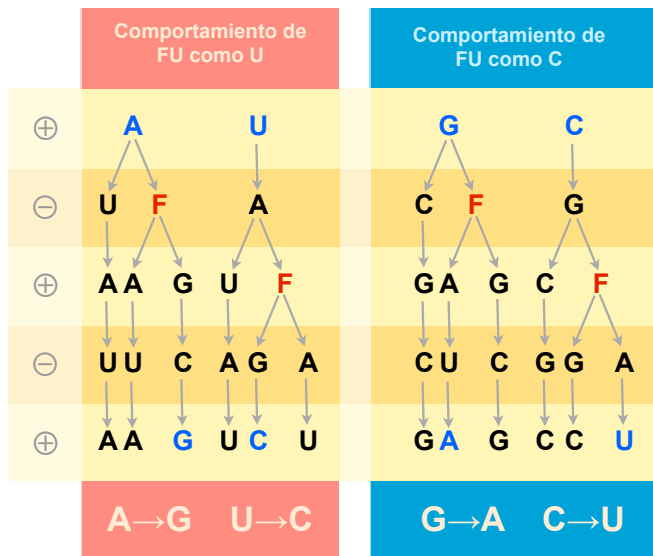


Figura 2.16 Mutaciones producidas por incorporación del fluorouracilo. Esquema de las mutaciones que pueden aparecer en el RNA viral como consecuencia de los apareamientos que se observan en fig. 2.15. A la izquierda se indica la hebra de RNA en la que se encuentra cada nucleótido. En la parte inferior se indican los tipos de mutaciones que en cada caso pueden tener lugar.

Las bases moleculares de la extinción de virus por mutagénesis letal mediada por análogos de nucleótido es un campo activo de investigación. Se vislumbra como una alternativa a los diseños antivirales clásicos, ya que pueden llegar a contrarrestar la capacidad de las cuasiespecies víricas de seleccionar mutantes de escape a las drogas usadas en los tratamientos. En estas investigaciones sobre mutagénesis letal se enmarca la presente tesis doctoral.

3 Objetivos

Los objetivos de la presente tesis doctoral son:

- 1.- Estudio de las bases moleculares de la resistencia a ribavirina (R) del VFA con las sustituciones M296I y G62S en 3D.
- 2.- Caracterización del VFA con la sustitución V173I en 3D, seleccionada en presencia de 5-fluorouracilo (FU).
- 3.- Estudio bioquímico de la proteína 3D(V173I).
- 4.- Caracterización del papel multifuncional de una región del extremo amino-terminal de 3D.
- 5.- Estudio bioquímico de la actividad helicasa de la proteína 2C.

4 Materiales y métodos

4.1 Cultivo de células eucariotas

La línea celular utilizada para las infecciones con el virus de la fiebre aftosa (VFA) es BHK-21, derivada de fibroblastos de riñón de hámster (Stoker & Macpherson, 1964), que fueron clonadas por dilución límite (de la Torre *et al.*, 1988). Se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Dulbecco & Freeman, 1959), suplementado con 5% de suero fetal bovino (SBF; Gibco, BRL), aminoácidos no esenciales (Sigma), 50 µg/ml de gentamicina (Sigma) y 0,00002% de parahidroxibenzoato de butilo (Sigma) usado como antimicótico. Las células se cultivaron hasta confluencia a 37°C, 7% de CO₂ y 98% de humedad. Una vez confluentes, se separaron de la placa por tratamiento con tripsina 0,05 mg/ml y 0,016% EDTA (Sigma) durante 2 minutos y se sembraron a la dilución apropiada. Los pases de células se realizaron cada 72 horas o menos y un máximo de 30 veces. Los procedimientos han sido descritos anteriormente (Domingo *et al.*, 1980; Sobrino *et al.*, 1983).

4.2 Virus

Los virus empleados en la presente tesis doctoral son todos derivados del clon infeccioso pMT28 (Toja *et al.*, 1999; García-Arriaza *et al.*, 2004). Los distintos clones infecciosos que expresan virus con mutaciones fueron producidos por mutagénesis dirigida, tal y como se describe en el apartado 4.14.

- pMT28wt: Plásmido que incluye la secuencia completa del VFA C-S8c1 (GenBank: AJ133357). Contiene 35 residuos de citidina en el poli(C), 25 adenosinas en el poli(A) y se expresa bajo el promotor de la SP6 polimerasa. El pMT28 presenta 3 cambios sinónimos y un cambio en la región no codificante respecto al C-S8c1 (García-Arriaza *et al.* 2004).

- pMT28-3D(M296I): Clon infeccioso con la sustitución M296I en la proteína 3D en el contexto de pMT28. Fue construido para estudiar la implicación de la sustitución M196I en resistencia a ribavirina (Sierra *et al.*, 2007).
- pMT28-3D(G62S): Clon infeccioso con la sustitución G62S en la polimerasa, que corresponde a la sustitución G64S de PV, que disminuye la fidelidad de la enzima (Pfeiffer & Kirkegaard, 2003).
- pMT28-3D(G62S-M296I): Clon infeccioso con las sustituciones G62S y M296I en la polimerasa.
- pMT28-3D(SSI): Clon infeccioso con las sustituciones P44S, P169S y M296I en la proteína 3D, que se fijaron secuencialmente en el VFA al replicarse en presencia de concentraciones crecientes de ribavirina (Agudo *et al.*, 2010).
- pMT28-3D(V173I): Clon infeccioso con la sustitución V173I en la proteína 3D. Dicha sustitución apareció en un virus pasado por la Dra. Macarena Sierra en presencia de 5-fluorouracilo.

Los plásmidos pMT28-3D(M296I), pMT28-3D(G62S) y pMT28-3D(G62S-M296I) fueron construidos por M. Sierra y pMT28-3D(SSI) por R. Agudo.

4.3 Agentes antivirales

Los compuestos antivirales utilizados en los experimentos en cultivos celulares fueron 5-fluorouracilo (FU), ribavirina (R) e hidrocloreto de guanidinio (GuH), todos ellos de Sigma.

Para preparar los medios de cultivo correspondientes se partió de disoluciones en DMEM de FU y GuH (50 mM) y de disoluciones de R en PBS (100 mM). Las disoluciones se esterilizaron por filtración, se diluyeron en DMEM y se suplementaron con 2% de SBF. El GuH se guardó a 4°C durante un periodo máximo de 15 días. El FU y la R se guardaron a -70°C por tiempo indefinido.

Las pautas del tratamiento con los distintos agentes antivirales empleados se basan en estudios anteriores sobre toxicidad celular y acción antiviral específica (Airaksinen *et al.*, 2003; Holland *et al.*, 1990; Pariente *et al.*, 2003; Pringle, 1970; Sierra *et al.*, 2000), y se resumen en la Tabla 4.1.

Compuesto	Concentración	Tiempo de preincubación
Ribavirina (R)	200-800 μ M	7-13 horas
5-fluorouracilo (FU)	50-400 mg/ml	7-13 horas
Cloruro de guanidio (Gu)	2-4 mM	sin preincubación

Tabla 4.1 Concentraciones de los agentes antivirales y períodos de preincubación en células BHK-21, antes de la infección. La concentración utilizada en la preincubación es la misma que se utiliza durante la infección.

4.4 Infecciones de células BHK-21 por el VFA

4.4.1 Infecciones en medio líquido

Las infecciones se llevaron a cabo tomando 0,2 ml de preparado de virus suspendido en DMEM para infectar una monocapa de $2-4 \times 10^6$ células BHK-21. El sobrenadante se aplicó a la monocapa, a la que previamente se le retiró el medio de cultivo (sin o con agente mutagénico) y lavada con DMEM. Las células se incubaron durante 60 minutos con el inóculo para permitir la adsorción y entrada de los virus en las células, agitando en cruz cada 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se lavó con 0,1 M tampón fosfato pH 6,0 para inactivar las partículas no absorbidas y con DMEM y se añadió el medio de cultivo, sin o con el agente antiviral. La recogida de virus se realizó normalmente a las 24 horas posinfección. El sobrenadante retirado fue almacenado a -70°C o utilizado directamente para infectar una nueva monocapa. Para realizar los pases seriados de virus se llevaron a cabo sucesivas infecciones estándar, empleando 0,2 ml del sobrenadante de la infección previa. Los virus recogidos fueron titulados mediante infecciones de VFA en monocapas de células BHK-21 en medio semisólido (apartado 4.4.2).

Los métodos de infección de células BHK-21 en medio líquido y los controles para asegurar ausencia de contaminaciones (mantenimiento de cultivos no infectados en paralelo, análisis periódicos por secuenciación para la identificación de virus, etc.) han sido descritos previamente (Baranowski *et al.*, 1998; Domingo *et al.*, 1980; Sierra *et al.*, 2007). Se indicarán las condiciones de infección (multiplicidad de infección

(m.d.i.), tiempo de recogida de virus, etc.) en los correspondientes apartados de Resultados.

4.4.2 Infecciones en medio semisólido. Titulación

Los títulos virales se determinaron por plaqueo en células BKH-21 bajo agar semisólido (Domingo *et al.* 1980; Sierra *et al.* 2007). Se infectó una monocapa de células con diluciones crecientes de virus en DMEM. Tras una hora de adsorción a 37°C en una atmósfera con 7% de CO₂, 98% de humedad, se lavaron las monocapas dos veces con DMEM y se añadió agar semisólido a una concentración final del 0,5% en medio DMEM con 2% de SBF y 1% de dietilaminoetil (DEAE)-dextrano. A continuación se incubó en las mismas condiciones de adsorción durante un tiempo apropiado (normalmente de 16 a 32 horas), dependiendo del experimento. Después de la incubación se fijaron las células con formaldehído al 2% y se tiñeron las monocapas fijadas con cristal violeta (2% cristal violeta en formaldehído al 2%). Todas las titulaciones para cuantificación de virus se realizaron al menos por triplicado.

4.5 Extracción del RNA viral

Se extrajo el RNA total, a partir de los sobrenadantes recogidos de las infecciones en medio líquido, mediante tratamiento con Trizol (Gibco), tal y como indica la casa comercial. El RNA extraído se precipitó con 1 volumen de isopropanol y el precipitado se lavó con etanol al 70%. El RNA se resuspendió en TE estéril y se almacenó a -70°C.

4.6 Obtención de cDNA y amplificación por RT-PCR

El RNA del VFA fue amplificado mediante retrotranscripción seguida de amplificación por PCR (RT-PCR). Para la reacción de retrotranscripción del RNA vírico se empleó la RT del virus de la mieloblastosis aviar AMV-RT (Promega). Para la reacción de amplificación se utilizó la DNA polimerasa termoestable EHF (Expand High Fidelity) (Roche). Esta polimerasa presenta alta fidelidad de copia, ya que posee

actividad correctora de errores (actividad exonucleasa 3'→5') (Barnes, 1994), para minimizar la incorporación de nucleótidos incorrectos por la polimerasa en el proceso de amplificación. Se siguieron las instrucciones facilitadas por el fabricante, realizando el proceso de amplificación por RT-PCR en un solo paso en el tampón y concentración óptima para la polimerasa EHF. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en un gel de

Temperatura (C°)	Tiempo (min:seg)	Ciclos
42	60:00	1
94	00:30	40
54-58	00:30	
68	2:40*	
68	10:00	1
10	>5:00	1

Tabla 4.2 Programa de RT-PCR para amplificar cDNA viral.

agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio o sybr-safe (Invitrogen Molecular Probes). Las condiciones de amplificación se indican en la Tabla 4.2 y los oligonucleótidos empleados en la Tabla 4.3.

Región	Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Orientación	Posición
5'UTR	CS8NR2	TAAGTTTTACCGTCTGTCCCG	S	368-388
	ND2	TTGTTACCAAGGAGGAGTT	A	760-742
L	LD5	TGCAGTCCGTGGTAGGAAAAG	A	1116-1096
	2BR3	GCCATCAGGACCGGTCTCGATG	S	4027-4048
2B	2BD1	CAAACGTGCTGTCCAGAATCTC	A	4192-4168
	2BR3SacI	TCCGAGCTCCGATTCTGTTGGCCGGGTTGG	S	4253-4282
	2BR2	GAAGACCTTGAGAGAGCAGAG	S	4318-4336
	2CR5	CCCAGCACCCAGCAAGTCGAG	S	4623-4643
2C	2CD2	GTACCAACAGAATCGGTCC	A	4764-4745
	2CD2New	GGGCAGTACCAACAGAATCG	A	4769-4749
	2CR2	GGCAAACCCCTTCAGCAGTAAG	S	4924-4944
	2CD3	CGCTCAGCTCGATGTCAAAGTG	A	5047-5026
	3AD3	GATGACGTGAACCTCTGAGCCCGC	A	5349-5329
3A	3AR1	AAAGGCCAACACGAGGCAGC	S	5344-5363
	3AD2	GCCTTCTGACCTGGAAGAGTTC	A	5699-5678
	3AR2	GAACCTTCCAGGTCAGAAGGC	S	5678-5699
	3AR3	GATGACGTGAACCTCTGAGCCCGC	S	5704-5726
	5'3C	AGTGGTGCCCCACCGACCGAC	S	5971-5991
3C	3CD1	CATGACCATCTTTTGCAGGTCAG	A	6009-5987
	3C1	GCGTTGTAAATCACGCCAAC	A	6335-6316
	PolCKpnl	GTTGGTACCACTCTGCTGGAGGC	S	6502-6525
3D	5'3D	GGGTTGATCGTTGATACCAGAG	S	6610-6632
	AV8	CAGCGGCGGAACAGCGCT	A	6839-6822
	3DR1	GAAACGCCGCGGTGCACCTATC	S	6984-7005
	AV3	TTCATGGCATCGCTGCAGTGG	A	7370-7350
	B2New	CACTGCAGCGATGCCATGAACATC	S	7351-7374
	3D-3'UTR	AATCTAGATGTTTGGGGGATTATGCG	A	8041-8016
3'UTR	Rend	TTTGGATTAAGGAAGCGGGAAAGCCC	A	8118-8092

Tabla 4.3 Oligonucleótidos empleados para la amplificación del RNA viral y secuenciación de DNA. En la primera columna se indica la región del genoma del VFA en la cual hibrida el oligonucleótido. Se especifica la secuencia del nucleótido, siempre de 5' a 3', donde los nucleótidos en negrita representan las variaciones respecto al VFA C-S8c1 y las secuencias subrayadas indican la presencia de una diana de restricción. S, "sentido" o de la misma polaridad que el RNA genómico del VFA; A, "antisentido" o de polaridad de la cadena negativa del VFA. Se indica la posición en el genoma del VFA según Escarmís *et al.*, 1999.

4.7 Purificación de DNA amplificado

Los productos de amplificación fueron purificados siguiendo distintos métodos dependiendo del tipo de análisis posterior. Al amplificar el cDNA para obtener la secuencia consenso de la población viral, se realizaron purificaciones por filtración del DNA total. Cuando el producto de la PCR tuvo que ser clonado en un vector, el producto de PCR se purificó de banda en gel de agarosa, siempre que se observasen bandas inespecíficas de DNA en el gel.

4.7.1 Purificación de DNA por filtración

Se han empleado tres kits comerciales distintos para la purificación por filtración del DNA: *Microcon centrifugal filters* (Millipore), *Amicon Ultra-0.5* (Millipore) o *Wizard PCR preps DNA purification resin* (Promega). En todos los casos se siguieron las indicaciones del fabricante, se eluyó con agua destilada estéril y se midió la concentración con un espectrofotómetro de amplio espectro (Nanodrop 1000).

4.7.2 Extracción de banda en gel de agarosa

Para obtener el DNA correspondiente a una longitud se emplearon dos métodos de extracción en gel: 1) Se recortó la banda deseada de un gel de agarosa al 1% y luego se trató con 3 volúmenes de yoduro sódico 5,3 M, para destruir uniones entre el DNA y la agarosa. A continuación se fundió la agarosa a 65°C, tras lo que se añadió la resina *Wizard PCR preps DNA purification resin* (Promega). Se lavó con isopropanol, se eluyó con agua destilada estéril y se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop 1000). 2) El producto de PCR se resolvió en gel de agarosa de bajo punto de fusión (NuSieve), del cual se extrajo la banda deseada, pero no se sometió a un filtrado posterior.

4.8 Secuenciación del DNA

La secuenciación de nucleótidos se efectuó mediante técnicas de secuenciación automática en los secuenciadores ABI373, ABI3730XL o ABI3700

(Applied Biosystems) por Macrogen. La reacción se efectuó con el kit *Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). El análisis de secuencias se llevó a cabo con el paquete DNA Star (Lasergene 8.0) mediante el análisis de cromatogramas. Cada secuencia se determinó con al menos dos reacciones independientes de secuenciación. Los oligonucleótidos empleados para la secuenciación de DNA se detallan en la Tabla 4.3.

4.9 Cuantificación de moléculas de RNA vírico mediante RT-PCR a tiempo real

La cuantificación de RNA vírico se realizó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real con el aparato “LightCycler” (Roche). Este método permitió medir la cantidad de producto de RNA amplificado en cada ciclo de la reacción de PCR mediante una sonda fluorescente (SYBR Green I). La fluorescencia emitida aumenta de forma proporcional a la cantidad del producto amplificado. Se utilizó el kit “Light Cycler RNA Master SYBR Green I” (Roche) y se siguieron las instrucciones facilitadas por el fabricante, optimizando la concentración de Mn^{++} a 3 mM. La enzima utilizada fue la *Tth* polimerasa, que es una enzima termoestable que posee actividad retrotranscriptasa y polimerasa (Myers & Gelfand, 1991), que permite realizar retrotranscripción y amplificación por PCR en una sola reacción. La región amplificada para la cuantificación de RNA vírico fue la codificante de 2C y los oligonucleótidos empleados fueron 2CD3 y 2CR2 (Tabla 4.3). El RNA de las muestras se cuantificó por extrapolación de los valores de fluorescencia obtenidos en una curva patrón realizada en paralelo con RNA de pMT28 (RNA transcrito a partir del plásmido pMT28wt, apartado 4.2), cuya concentración fue determinada por su densidad óptica a 260 nm y confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa.

La especificidad de las reacciones de amplificación se comprobó con el análisis de la curva de fusión del DNA amplificado, que permite distinguir entre el producto de amplificación específica y productos artefactuales de bajo peso molecular (como dímeros de oligonucleótidos), que presentan una temperatura de fusión más baja.

4.10 Clonaje molecular para el análisis de espectros de mutantes de poblaciones del VFA

Para analizar los espectros de mutantes de poblaciones virales, cDNAs correspondientes a genomas individuales de una cuasiespecie fueron clonados en el vector pGEM-T o pGEM-T Easy.

Para asegurar que había un exceso de RNA viral en el proceso de amplificación de los fragmentos a clonar y así evitar que hubiera duplicación de genomas clonados, se utilizaron solamente muestras para las cuales una amplificación con 1/100 del molde inicial fue positiva. Para amplificar 3D se emplearon los oligonucleótidos PolCKpnI y Pol1XbaI (Tabla 4.3) que amplifican los residuos 6526 a 8015 del genoma. El producto de RT-PCR (apartado 4.6) se purificó (apartado 4.7) y se ligó al vector pGEM-T. La ligación está favorecida por los extremos prominentes de A, que la enzima EHF suele dejar en el producto de amplificación, que hibridan con las colas de poli-T que componen el sitio de clonación de pGEM-T. Los productos de ligación se introdujeron por transformación de choque térmico en células competentes de *E. coli* DH5 α . El vector pGEM-T incluye un gen de resistencia a ampicilina y el gen LacZ en el sitio de clonación, lo que permite la selección por color en presencia de X-Gal e IPTG. El DNA de las colonias positivas identificadas por ausencia de color se amplificó con *Illustra TempliPhi 100 amplification kit* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante y el producto se analizó mediante secuenciación de nucleótidos (apartado 4.8).

4.11 Determinación de la eficacia biológica

Para la determinación de la eficacia biológica relativa o *fitness* de un virus problema, este se sometió a pases seriados en competición con un virus de referencia (Holland *et al.*, 1991). La competición se inició con la coinfección de células BHK-21 a una m.d.i. de 0,1 PFUs/cél. con una mezcla que contenía la misma infectividad de ambos virus en el pase inicial. Se emplearon las condiciones de infección descritas en el apartado 4.4.1., en ausencia o presencia de agentes antivirales. Cuando el efecto citopático fue completo, se recogió el sobrenadante de infección. Antes de infectar una nueva monocapa, el sobrenadante recogido se diluyó 10 veces para evitar que la

m.d.i. fuera superior a 1. Cuando las coinfecciones transcurrieron en presencia de agente antiviral, retrasando la aparición de efecto citopático, la recogida del sobrenadante se realizó a las 36 horas y no hubo dilución previa a la siguiente infección.

La cuantificación de la proporción de los dos virus competidores en el transcurso de los pases se realizó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (apartado 4.9). Para distinguir entre los RNAs provenientes de uno u otro virus, la RT-PCR se llevó a cabo con parejas de oligonucleótidos capaces de discriminar las mutaciones que diferencian al virus problema del de referencia (Tabla 4.4). Ensayos preliminares mostraron que las condiciones utilizadas para la amplificación garantizan una discriminación de al menos 30 veces entre los virus competidores.

La representación del logaritmo de la proporción de los dos genotipos que compiten frente al número de pases da el vector de eficacia biológica (Duarte *et al.*, 1992). El antilogaritmo de la pendiente es el valor numérico de eficacia biológica del virus problema frente al de referencia.

Sustitución a distinguir	Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Orientación	Posición
3D(V173I)	V173	CGCCCGATGGAGAAA GTA	S	7111-7128
	I173	CGCCCGATGGAGAAA ATC	S	
	AV3	TTCATGGCATCGCTGCAGTGG	A	7370-7350

Tabla 4.4 Oligonucleótidos empleados para la determinación de la eficacia biológica relativa de pMT28-3D(V173I). En la primera columna se indica la región del genoma del VFA en la cual hibrida el oligonucleótido y la sustitución que se desea discriminar. Se especifica la secuencia del nucleótido, siempre de 5' a 3', donde los nucleótidos en negrita representan las variaciones respecto al VFA C-S8c1. S, "sentido" o de la misma polaridad que el RNA genómico del VFA; A, "antisentido" o de polaridad de la cadena negativa del VFA. Se indica la posición en el genoma del VFA según Escarmís *et al.*, 1999.

4.12 Determinación de la frecuencia de mutación y entropía normalizada de Shannon de los espectros de mutantes

Para evaluar el efecto mutagénico de un compuesto, se analizaron las secuencias de un espectro de mutantes, obtenidas por clonaje molecular (apartado 4.10). La frecuencia de mutación es el cociente entre el número de mutaciones distintas que aparecen en la muestra y el número total de nucleótidos analizados. La frecuencia de mutación específica para una mutación definida se determina dividiendo el número de veces que aparece la mutación específica por el número total de nucleótidos analizados.

La entropía normalizada de Shannon (Sn) es una medida alternativa de la complejidad de la cuasiespecie, donde un valor de 0 se corresponde con una homogeneidad máxima (todas las secuencias analizadas son iguales entre sí) y el valor 1 con una heterogeneidad máxima (todas las secuencias analizadas son distintas entre sí) (Airaksinen *et al.* 2003; Gregori *et al.*, 2014, Moreno *et al.*, 2011; Pariente *et al.*, 2003; Ruiz-Jarabo *et al.*, 2000; Sierra *et al.*, 2007; Volkenstein, 1994).

La entropía de Shannon normalizada se calcula mediante la ecuación:

$$S_n = - [\sum_i (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$$

En la que p_i es la frecuencia de cada secuencia en la cuasiespecie y N es el número total de secuencias analizadas.

4.13 Obtención de clones biológicos del VFA

El virus se diluyó de manera que, al aplicarlo a una monocapa, no se produjeran más de 20 placas de lisis, en una infección en medio semisólido (apartado 4.4.2). Se seleccionaron placas aisladas y el agar situado sobre la zona de lisis se sumergió en 500 µl de DMEM y se almacenó a -70°C. Se determinaron los títulos de los virus extraídos de placas individuales (apartado 4.4.2).

4.14 Obtención de clones infecciosos del VFA

El clon infeccioso elaborado en la presente tesis doctoral (pMT28-3D(V173I); apartado 4.2) se construyó a partir del clon infeccioso de referencia pMT28wt mediante PCR mutagénica y clonaje molecular. El primer paso consistió en dos amplificaciones (① y ② en la Figura 4.1.A) mediante PCR mutagénica de dos segmentos solapantes del plásmido original, a partir de las parejas de oligonucleótidos A, C y B, D. Los oligonucleótidos A y B contienen la mutación que se desea introducir en el plásmido (Tabla 4.5). Los productos de las amplificaciones 1 y 2 se recombinaron en una reacción de PCR *shuffling*, utilizando cantidades equimolares de ambos fragmentos y mediante los oligonucleótidos E, F; así se obtuvo un fragmento que contiene la mutación y las dianas de restricción r1 y r2 (Figura 4.1.B). El

fragmento obtenido y el plásmido vector pMT28, fueron digeridos por los sitios de restricción r1 y r2. El vector fue tratado con fosfatasa alcalina (USB) para evitar la religación del plásmido. El fragmento con la mutación se insertó en el vector empleando T4 DNA ligasa (Roche) (Figura 4.1.C).

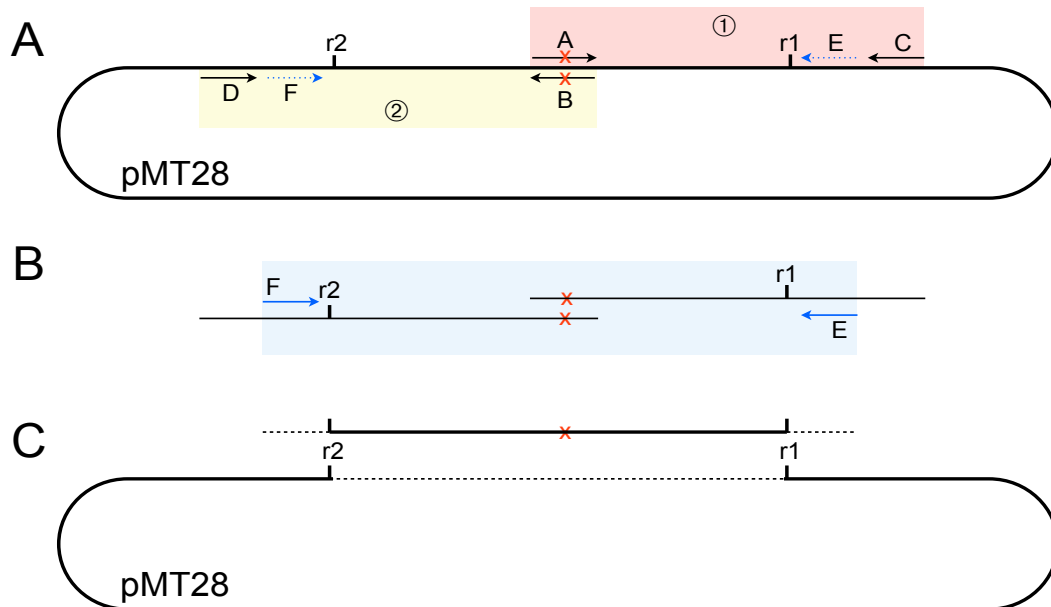


Figura 4.1 Representación esquemática de la estrategia de construcción de clones infecciosos. A) Se muestran las dos reacciones de PCR mutagénicas, donde cada flecha representa un oligonucleótido, la cruz roja indica la presencia de la mutación que se desea introducir en el plásmido y r1/r2 representan los sitios de restricción escogidos para el clonaje. B) PCR *shuffling* de los productos de las PCRs 1 y 2. C) Digestión para la ligación del fragmento con la mutación con el plásmido. Las líneas discontinuas representan los fragmentos generados por digestión que son descartados.

	Oligonucleótido	Enzima de restricción	Secuencia (5'→3') / Sitio de restricción	Posición
A	V173Iplus		CGCCCGATGGAGAAA AT CCGTGCCGGC	7111-7137
B	V173Iminus		GCGAGTCTTGCCGGCACG GAT TTTCTCCATCGGG	7146-7113
C	Pol1XbaI		AAT CTAG ATGTTTGGGGGATTATGCG	8041-8016
D	PolCKpn1		GTTGGT TAC CACTCTGCTGGAGGC	6502-6525
E	AV2New		TGTGGAAGTGTCTTTTGAGGAAAG	7783-7760
F	5'3D		GGGTTGATCGTTGATACCAGAG	6610-6632
r1		BamHI	...G GATCC... ...CCTAG G...	7427
r2		Clal	...AT CGAT... ...TAGC TA...	7004

Tabla 4.5 Oligonucleótidos y enzimas de restricción utilizados para la construcción de pMT28-3D(V173I). La primera columna indica la función del oligonucleótido según el esquema de la Figura 4.1; la segunda columna da el nombre del oligonucleótido y la tercera, la enzima de restricción implicada en la construcción. En la cuarta columna se especifica la secuencia del oligonucleótido de 5' a 3' y la secuencia de las dianas de restricción (subrayadas); los nucleótidos en negrita representan las variaciones respecto al VFA C-S8c1 y en rojo las mutaciones que dan lugar al cambio de aminoácido deseado. En la última columna se indica la posición en el genoma del VFA según Escarmís *et al.*, 1999.

En todas las reacciones de amplificación se empleó la polimerasa *Pfu ultra*, por su elevada fidelidad de copia; los productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Asimismo, antes de cada paso se purificó el DNA con *Microcon centrifugal filters* (Millipore) o extracción en gel y se secuenció la región de 3D para comprobar que las mutaciones fueron introducidas correctamente.

4.15 Transcripción de clones infecciosos

El DNA de los clones infecciosos fue linearizado por digestión con *NdeI*. El plásmido digerido se purificó utilizando el kit *Wizard PCR Preps DNA purification resin* (Promega). La reacción de transcripción se llevó a cabo utilizando *SP6 RNA polimerasa* (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración de RNA obtenida se estimó mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con SYBR safe (Invitrogen) por comparación con cantidades conocidas de RNA ribosómico.

4.16 Transfección de RNA viral procedente de la transcripción de clones infecciosos

Se transfectaron células BHK-21 subconfluentes (confluencia de aproximadamente 70%) con RNA viral (0,1-1mg) transcrito a partir de los correspondientes plásmidos linearizados (apartado 4.15) y lipofectina (Gibco). Los virus recogidos del sobrenadante de las células transfectadas a las 72 horas post-transfección se multiplicaron mediante dos pases en células BHK-21 ($2-4 \times 10^6$ células) con 200 μ l de sobrenadante. Se extrajo RNA del virus procedente del último pase y la región codificante de la proteína 3D fue amplificada y secuenciada para comprobar la presencia de las mutaciones introducidas en el clon infeccioso. El virus recogido en el último pase es considerado como “pase 0”.

4.17 Construcción de plásmidos de expresión de proteínas

4.17.1 Construcción de plásmidos de expresión de 3D

Todas las variantes de 3D utilizadas en esta tesis doctoral se han construido a partir del plásmido pET-28a3D (Arias *et al.*, 2005), un derivado del plásmido pET-28a (Novagen) que contiene la secuencia codificante de 3D de C-S8c1 en la que ha sido eliminada una diana de restricción *NcoI*. En el plásmido pET-28a3D, la secuencia de 3D queda fusionada a una secuencia propia del plásmido. De esta manera, la proteína 3D queda unida por su extremo carboxilo a 11 aminoácidos suplementarios, de los que 5 actúan de espaciador y 6 comprenden una cola de histidinas (AAALEHHHHH).

Las distintas polimerasas mutantes se obtuvieron empleando el kit *Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene), mediante amplificación del pET-28a3D circular completo con oligonucleótidos que contienen las mutaciones que se desean introducir en la región codificante de 3D (Tabla 4.6). La reacción de PCR se realizó con la DNA polimerasa *Pfu Ultra* (Roche) y el producto se trató con *DpnI*, una endonucleasa que actúa sobre el DNA metilado, degradando el molde (proveniente de *E. coli*).

Sustitución	Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Posición en pMT28
V173I	V173Iplus	CGCCCGATGGAGAAA ATC CGTGCCGGC	7111-7137
	V173Iminus	GCGAGTCTTGCCGGCACG GAT TTTCTCCATCGGG	7146-7113
K18A	K18Aplus	CATGTAATGCGC GCC ACCAAGCTTGCAACC	6649-6677
	K18Aminus	GGTGCAAGCTTGGT GGC GCGCATTACATG	6677-6649
K20A	K20Aplus	TAATGCGCAAAACC GCC CTTGCACCCACC	6653-6681
	K20Aminus	GGTGGGTGCAAG GGC GGTTTTCGCGATTA	6681-6653
K18A/K20A	K18AK20Aplus	GTAATGCGC GCC ACC GCC CTTGCACCC	6652-6678
	K18AK20Aminus	GGGTGCAAG GGC GGT GGC GCGCATTAC	6678-6652

Tabla 4.6 Oligonucleótidos utilizados para la construcción de los plásmidos de expresión de proteínas. En la primera columna se indica la sustitución que se desea introducir en la proteína 3D. Se especifica el nombre y la secuencia del oligonucleótido, donde los nucleótidos en rojo representan los tripletes que codifican las sustituciones aminoacídicas respecto al VFA C-S8c1. Se indica la posición en el genoma del VFA según Escarmís *et al.*, 1999.

Se transformaron células competentes *E. coli* DH5α con el producto de PCR y se aislaron las bacterias resultantes en placas Petri con medio LB con kanamicina (70 µg/ml, Sigma). Se comprobó la presencia de las mutaciones introducidas mediante secuenciación del DNA plasmídico extraído con el kit *Wizard Plus SV Minipreps*

(Promega). Los plásmidos con las mutaciones deseadas se transformaron en células competentes *E. coli* BL21. Mediante extracción del DNA plasmídico y posterior secuenciación se comprobó que durante el proceso de transformación no se alteró la secuencia del plásmido de interés.

4.17.2 Construcción de plásmidos de expresión de 2C

Construcción de pET-28a2C₍₃₄₋₃₁₈₎

La delección de los primeros 33 aminoácidos de la proteína 2C se llevó a cabo a partir del plásmido de expresión pET28a2C, obtenido por el Dr. Rubén Agudo mediante clonaje de la región codificante de 2C de C-S8c1 en pET-28a (Novagen). La secuencia que codifica 2C está fusionada a una secuencia propia del plásmido, de tal forma que en el extremo N-terminal de 2C se hallan 19 aminoácidos adicionales (GSSHHHHHHSSGLVPRGSH) para facilitar la purificación y procesamiento de la proteína.

El primer paso para la obtención de pET-28a2C₍₃₄₋₃₁₈₎ fue la introducción de una diana de restricción *NdeI* en el residuo 33 de 2C en el pET28a2C, mediante amplificación con los oligonucleótidos 2C(34-)*NdeI*5' y 2CEcoRI3' (Tabla 4.7), de los cuales el primero contiene las mutaciones necesarias para obtener la diana de restricción. El producto de la PCR se digirió con *NdeI* y *EcoRI* (New England Biolabs) y se clonó en pET-28a tratando previamente con fosfatasa alcalina (USB). La introducción de la diana de restricción se confirmó por secuenciación.

Cambio	Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Posición en pMT28
<i>NdeI</i>	2C(34-) <i>NdeI</i> 5'	CCGCGACTGGATTAAGGC CATATG GCCACTGTTGTG TTGAAAGACTCC	4422-4470
	2CEcoRI3'	CACAGATTTTGGGAGAATTC CTATCA TTGCTTAAAAA TTGGGTGGCTTGACAC	5325-5272
M34L	2C(34-)M34Lnew-plus	GGCACATAT C GCCTCAGAAGAGAAGTTTGTCCACC	4437-4470
	2C(34-)M34Lnew-minus	CTCTTCTGAGGC G ATATGTGCCTTAATCCAGTCGC	4458-4424

Tabla 4.7 Oligonucleótidos empleados para la construcción del plásmido de expresión de 2C con los 33 primeros aminoácidos delecionados (*NdeI*) y restitución de L34 (M34L). Se especifica la secuencia del oligonucleótido, siempre de 5' a 3', donde los nucleótidos en negrita representan las variaciones respecto al pET28a2C, los codones de terminación de la traducción se representan en azul y las secuencias subrayadas indican la presencia de una diana de resticción. Se indica la posición en el genoma del VFA según Escarmís *et al.*, 1999.

La presencia del sitio NdeI en el extremo 5' de la región codificante de 2C₍₃₄₋₃₁₈₎ provoca el cambio de aminoácido L34M. Para restablecer el residuo original se empleó el kit *Quickchange Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene), usando los oligonucleótidos 2C(34-)M34Lnew-plus y 2C(34-)M34Lnew-minus (Tabla 4.7). La reacción de mutagénesis y posterior transformación en bacterias *E.coli* DH5 α y *E.coli* BL21 se realizaron como se describe en el apartado 4.17.1.

4.18 Expresión de 2C y 3D recombinantes en *E. coli*

Las colonias de *E.coli* BL21 seleccionadas en presencia de kanamicina (presencia de pET-28a) se crecieron durante 12h-15h en medio LB en presencia de kanamicina (70 mg/ml). Los cultivos se diluyeron 20 veces y se crecieron hasta alcanzar una densidad óptica (595 nm) de entre 0,8 y 1,2. En ese momento (fase exponencial), se añadió IPTG (isopropilo-tio- β -D-galactósido) (Fermentas) a una concentración final de 1 mM. Los cultivos se crecieron entonces durante 2,5 horas más. Las células fueron centrifugadas a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos en un rotor S3 (Sorvall), obteniéndose un sedimento de células que se congeló a -20°C.

4.19 Purificación de 3D y 2C

La cola de histidinas en el extremo C-terminal de las 3D expresadas en *E. coli* (apartado 4.17.1) o en el extremo N-terminal de 2C (apartado 4.17.2) se utilizó para la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad por níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA)-agarosa *ProBond Resin* (Invitrogen). El sedimento de bacterias que expresan las proteínas (apartado 4.18) se resuspendió en tampón fosfato 50 mM pH 7,8 con 300 mM NaCl y se incubó durante 15 minutos a 4°C con agitación en presencia de 0,1 mg/ml lisozima (Sigma) y 1 mM fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF, Boehringer). La suspensión se lisó alternando 4 ciclos de sonicación de 30 segundos con 4 ciclos de 30 segundos en hielo. La fracción soluble se recuperó mediante dos centrifugaciones sucesivas de 15 minutos a 10.000 r.p.m. en un rotor SS-34 (Sorvall). La muestra se pasó a través de la columna de Ni-NTA que previamente fue equilibrada en el tampón de resuspensión. La proteína unida se lavó secuencialmente

con 2 volúmenes de tampón de resuspensión, 1 volumen de tampón A (ver apartado 4.25) y 1 volumen de tampón A conteniendo 25 mM imidazol.

La proteína unida a la columna se eluyó en un gradiente de imidazol (entre 50 y 500 mM) en tampón A. Las fracciones se analizaron mediante electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida en presencia de 0,1% SDS (SDS-PAGE). Las fracciones con la proteína pura según tinción por azul de coomassie (0,25% *Coomassie Brilliant Blue R250* (BioRad), 45% metanol, 10% ácido acético y lavado en 10% etanol, 10% ácido acético) se juntaron y dializaron a 4°C frente al tampón de diálisis (ver apartado 4.25). El proceso de diálisis se realizó con tres cambios de tampón, uno después de la noche y los otros dos a intervalos de 3 horas.

Las fracciones con proteína purificada se distribuyeron en alícuotas y se congelaron a -70°C. Todas las polimerasas recombinantes aisladas presentaron una pureza superior al 95%. La concentración de proteína se determinó mediante absorbancia y con el coeficiente de extinción molar de 3D de VFA de 51.700 M⁻¹ [servidor informático ExPASy (<http://www.expasy.org>)].

4.20 Ensayos de actividad de la polimerasa del VFA

4.20.1 Ensayo de síntesis de un homopolímero

Consiste en la síntesis de la cadena complementaria de un molde de poli(A) de aproximadamente 300 residuos y empleando un cebador de 15 nucleótidos de desoxitimidina [oligo(dT)₁₅], tal y como ha sido previamente descrito (Arias *et al.* 2005). Este ensayo estándar nos permite normalizar la actividad enzimática de distintas polimerasas mutantes en relación con la de tipo silvestre.

Las reacciones se llevaron a cabo en tampón 30 mM MOPS, pH 7,0, 33 mM NaCl, 5 mM Mg(CH₃COO)₂, 40 ng/μl poli(A) (Amersham), 2,4 μM oligo(dT)₁₅ (Invitrogen) y [α-³²P] UTP a una concentración final de 500 μM (0,01 mCi/ml, Amersham). La reacción se inició al añadir 2 μl de 3D sobre una mezcla precalentada a 37°C que contiene todos los reactivos indicados. Las concentraciones de las proteínas a ensayar se igualaron a la de 3Dwt antes del ensayo. La reacción se paró a

los 5 minutos añadiendo EDTA a una concentración final de 83 mM. El producto se aplicó sobre una membrana DE-81 (Whatmann) y se dejó secar. El UMP no incorporado se eliminó mediante 4 lavados de la membrana con un exceso de 0,2 M Na_2HPO_4 (Merck). Se realizó un lavado adicional en etanol absoluto y se secó durante 15 minutos a 55°C. Las membranas fueron expuestas a placas fotosensibles (Fujifilm BAS-MP 2040S) y la radiactividad incorporada medida en un densitómetro BAS-1500 (Fujifilm) usando el programa Tina versión 2.09e (Raytest Isotopenmessgerate GmbH, Staubenhardt, Alemania). Se calculó la actividad relativa de polimerización de cada 3D mutante con respecto a 3Dwt.

4.20.2 Ensayos de uridilación de VPg

La capacidad de cada polimerasa para uridilar el péptido VPg fue estimada mediante dos ensayos bioquímicos: con Mn^{++} y poli(A) o con Mg^{2+} , RNA cre y 3CD.

En el ensayo en presencia de Mn^{++} , la mezcla de reacción contenía 30 mM MOPS, pH 7,0, 33 mM NaCl, 0,6 mM MnCl_2 , 40 ng/ μl poli(A) (de aproximadamente 300 nucleótidos de longitud de media), 150 μM VPg-1 (sintetizada por el Servicio de Química de Proteínas y Síntesis de Péptidos del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”), 8% glicerol, 0,4 mg/ml BSA (New England Biolabs) y 50 μM [α - ^{32}P UTP] (0,01 mCi/ml; 200 mCi/nmol). La reacción se desarrolló durante 30 minutos a 37°C y se paró mediante la adición de EDTA a 83 mM final.

Para el ensayo en presencia de Mg^{++} la mezcla de reacción contenía 30 mM MOPS, pH 7,0, 33 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 20 nM RNA cre (obtenido mediante transcripción *in vitro*), 0,16 μM 3CD (expresada y purificada en nuestro laboratorio), 150 μM VPg-1, 8% glicerol, 0,4 mg/ml BSA (New England Biolabs) y 50 μM [α - ^{32}P UTP] (0,01 mCi/ml; 200 mCi/nmol). La reacción se mantuvo durante 3 horas a 37°C y se paró mediante la adición de EDTA a 83 mM final.

Para los ensayos de inhibición de uridilación del péptido VPg se utilizaron concentraciones crecientes (0-100 μM) de FUTP (Jena Bioscience). Los productos de reacción se resolvieron en geles de poliacrilamida al 20% con SDS con tampón Tris-tricina. Los geles fueron expuestos a placas fotosensibles y la radiactividad incorporada medida en un densitómetro BAS-1500 (Fujifilm), usando el programa Tina versión 2.09e.

4.21 Preparación de complejos molde-cebador heteropoliméricos

Con el fin de estudiar la incorporación de distintos nucleótidos catalizada por las polimerasas 3Dwt y 3D mutantes, se han empleado las moléculas de RNA representadas en la Figura 4.2. La mayoría de estas moléculas fueron diseñadas de tal forma que una misma secuencia pueda hibridar consigo misma y poder actuar como molde y cebador de la reacción (Arnold & Cameron, 2000). Estos RNAs se denominan sym/subs, seguido de la abreviatura de nucleótidos según su secuencia (Figura 4.2).

sym/sub AU	³² P-5'-CGUAGGGCCC-3' 3'-CCCGGGAUGC-5'- ³² P	sym/sub AC	³² P-5'-UGCAGGGCCC-3' 3'-CCCGGGACGU-5'- ³² P
sym/sub UA	³² P-5'-GCAUGGGCCC-3' 3'-CCCGGGUACG-5'- ³² P	sym/sub CA	³² P-5'-GUACGGGGCCC-3' 3'-CCCGGGCAUG-5'- ³² P
sym/sub UG	³² P-5'-ACGUGGGCCC-3' 3'-CCCGGGUGCA-5'- ³² P	sym/sub Fu	³² P-5'-ACGFuGGGGCCC-3' 3'-CCCGGGFuGCA-5'- ³² P
M13	³² P-5'-CGAUCGCCCU-3' 3'-GCUAGCGGGAAGGGUUGUCAACGCGUCGGACUUACGCUUACCGC-5'		

Figura 4.2 Secuencia de los seis RNA sym/sub (molde/cebador) utilizados. Se incluye también un molde/cebador no simétrico (M13), empleado en los ensayos de procesividad.

Todos los RNAs (Dharmacon) fueron marcados radiactivamente e hibridados tal como se describe a continuación.

4.21.1 Marcaje en 5' de complejos molde-cebador con ³²P

Los cebadores fueron marcados en el extremo 5' con [γ -³²P] ATP (5 μ Ci, 10 mCi/ml) (Amersham) empleando 10 unidades de polinucleótido kinasa de T4 (New England Biolabs). La reacción tuvo lugar en presencia de 70 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT y [γ -³²P] durante 45 minutos a 37°C. La polinucleótido kinasa fue

inactivada por calor (10 minutos a 90°C) y la marca libre eliminada mediante columnas de Sephadex G-25 (*Mini Quick Spin Oligo Columns*; Roche).

4.21.2 Hibridación de RNA

Los complejos molde-cebador (tanto marcados como no marcados) fueron hibridados mediante incubación del RNA a 90°C durante 1 minuto y posterior enfriamiento paulatino en un termociclador *Mastercycler* (Roche) hasta alcanzar 10°C. Las concentraciones de sym/sub indicadas en cada experimento hacen referencia a la concentración final del RNA hibridado.

4.22 Ensayo de retardo de RNA en gel

Para comparar la capacidad de unir RNA de las distintas polimerasas purificadas, se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel. La mezcla de la reacción incluía un híbrido de RNA (cuya concentración y secuencia se indica en cada caso en Resultados), 100 mM MOPS pH 7,0, 10 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 5% (p/v) polietilenglicol, 20 mM NaCl y concentraciones crecientes de 3D (250-2000 nM). Dichas mezclas se incubaron a 33°C o 37°C durante 10 minutos, tras los cuales se aplicaron a un gel de poliacrilamida al 4% en tampón TAE-EMSA y 5% glicerol. Para controlar que no hubiera uniones inespecíficas se incubó el RNA con BSA (New England Biolabs). La electroforesis tuvo lugar a 200 V, 4°C, 60 minutos en tampón TAE-EMSA. Los geles se secaron previamente a ser expuestos a placas fotosensibles para densitometría.

4.23 Ensayos de incorporación de nucleótidos

4.23.1 Ensayos de incorporación de nucleótidos en sym/sub

Con el fin de evaluar la eficiencia de incorporación de distintos nucleótidos sobre el RNA por las polimerasas purificadas, se llevaron a cabo ensayos de elongación de RNA sym/sub (Agudo *et al.*, 2010; Ferrer-Orta *et al.*, 2010) (Figura 4.2).

Para medir incorporación de nucleótidos en primera posición, la mezcla de reacción (30 mM MOPS pH 7,0, 15 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 1 U/ μl RNAsin (Promega), 2 μM de 3D, 0,5 μM de [^{32}P]-sym/sub) se preincubó a 37°C durante un mínimo de 15 minutos y variable según la polimerasa a ensayar, para permitir la formación del complejo 3D-RNA. Tras la preincubación, la reacción se inició mediante la adición del NTP cuya incorporación se quiere medir, acompañado de un exceso de molde no marcado, que sirve como captador de 3D libre y evitar medir incorporaciones por recambio de molde. Para medir incorporación de nucleótidos en segunda posición, la mezcla de reacción contuvo, además de lo indicado arriba, 1 μM del nucleótido a incorporar correctamente en primera posición. La reacción se paró con 83 mM de EDTA a distintos tiempos. Se utilizó ATP, UTP, CTP y GTP de Amersham, RTP de Moraveck y FUTP de Jena Bioscience.

El producto del ensayo se mezcló a partes iguales con un tampón para RNA (95% (v/v) de formamida desionizada, 0,025% (p/v) de azul de bromofenol, 0,025% (p/v) de xilen-cianol, 5 mM EDTA pH 8,0 y 0,025% (p/v) SDS) y la mezcla calentada a 70°C durante 10 minutos. Se aplicó a un gel de poliacrilamida al 23% con 7 M urea en TBE y se sometió a electroforesis a 3000 V. Los geles con los productos de la reacción resueltos por electroforesis fueron expuestos a placas fotosensibles y densitometrados como se ha descrito en apartados anteriores.

4.23.2 Ensayos de incorporación mediante *Rapid Quench Flow*

Con el objetivo medir incorporación de nucleótidos en condiciones de estado pre-estacionario (tiempos cortos), se empleó la técnica del *quench-flow* (KinTec Corp.) (Arias *et al.*, 2008). Estos ensayos se realizaron durante una estancia del doctorando en el laboratorio del Dr. S. Sarafianos (Universidad de Missouri).

Las reacciones de incorporación en primera posición tuvieron lugar a 37°C en 50 mM HEPES pH 7,5, 5 mM MgCl_2 y 10 mM 2-mercaptoetanol. La proteína 3D (a 1 μM de enzima activa) se preincubó con 1 μM de [^{32}P]-sym/sub a 37°C durante un mínimo de 15 minutos, para permitir la formación del complejo 3D-RNA. Para medir incorporación de nucleótidos en segunda posición, se añadieron a la preincubación de 3D con sym/sub 10 μM del nucleótido a incorporar correctamente en primera posición. 17 μl de esta solución fueron cargados en una de las dos entradas de la máquina de *quench-flow*, y el nucleótido a incorporar, disuelto en el mismo tampón, entró en el aparato a través de la otra entrada. Los reactivos se juntaron en el interior del aparato,

reduciendo sus concentraciones en un 50%. Las reacciones se pararon a distintos tiempos (0,01 - 5 segundos) con 0,5 M de EDTA, recogiendo un mínimo de 7 puntos para cada concentración de nucleótido ensayada. Los productos de elongación se resolvieron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 23% y 7 M urea. Las placas fotosensibles fueron escaneadas con Typhoon FLA 9000 (GE Healthcare) y cuantificadas con ImageJ 1.45s.

4.23.3 Análisis de datos cinéticos en condiciones de estado pre-estacionario

La cantidad de producto generado con cada concentración de nucleótido se representó gráficamente en función del tiempo de reacción. Los datos se ajustaron a una ecuación de "fase inicial rápida" ($P = A \cdot (1 - e^{-k_{\text{obs}} \cdot t}) + k_{\text{ss}} \cdot t$) usando una regresión no lineal con la ayuda del software informático "GraphPad Prism 4" (GraphPad Inc.). En la fórmula, A es la amplitud de la fase inicial rápida, que representa el complejo 3D-sym/sub en el comienzo de la reacción; k_{obs} es la constante de velocidad de elongación observada en la incorporación del nucleótido, k_{ss} es la constante de velocidad del estado estacionario, y t es el tiempo de reacción. La constante de velocidad de la fase lineal (k_{cat}) se obtuvo dividiendo la pendiente de la fase lineal por la concentración de enzima. Para obtener la constante de disociación $K_{\text{d,NTP}}$ para la unión del nucleótido al complejo 3D-sym/sub, las constantes de velocidad de elongación observadas (k_{obs}) se trazaron en una gráfica frente a la concentración de nucleótido y los datos se ajustaron a una ecuación hiperbólica ($k_{\text{obs}} = (k_{\text{pol}} \cdot [\text{NTP}]) / (K_{\text{D-NTP}} + [\text{NTP}])$) mediante regresión no lineal, donde k_{pol} es la tasa óptima de incorporación del nucleótido.

4.23.4 Ensayo de procesividad

Para determinar la procesividad (permanencia de 3D en la misma molécula de molde durante la polimerización), se llevaron a cabo ensayos de elongación empleando el molde/cebador [^{32}P]-M13 (Fig. 4.2). 2,5 μM de 3D se incubaron con 0,5 μM de M13 en presencia de 30 mM MOPS, 15 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ y RNAsin (1 U/ μl ; Promega) durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añadió una mezcla de ATP, UTP y CTP (a una concentración final de 50 μM cada uno) junto con un

exceso de molde sin marcar (5 μ M) que actúa como captador. La reacción tuvo lugar durante 5 minutos y se detuvo mediante la adición de EDTA. El análisis posterior fue igual al descrito en el apartado 4.23.1.

4.24 Ensayos de actividad de la proteína 2C del VFA

4.24.1 Ensayos de actividad ATPasa

Con el objeto de confirmar que las proteínas 2C purificadas con los primeros 33 aminoácidos delecionados conservan su actividad, se llevaron a cabo ensayos de actividad ATPasa. La reacción tuvo lugar en 50 mM MOPS pH7,5, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT y 1 μ M [$\gamma^{32}P$] ATP, a 37°C; se inició con la adición de 2C (3 μ M concentración final) y fue detenida trascurridas 2 horas mediante la adición de EDTA. El producto de la reacción se aplicó a una placa de PEI-celulosa (TLC 20x20; Merck). La cromatografía en capa fina se resolvió con 0,85 M NaH_2PO_4 y fue analizada en un densitómetro BAS-1500 (Fujifilm).

4.24.2 Ensayos de desestabilización de ácidos nucleicos

La separación de las hebras de DNA por 2C fue observada mediante ensayos de actividad helicasa (Adedeji *et al.*, 2012) con moldes marcados fluorescentemente con cianina (Cy3, Integrated DNA Technologies). Estos ensayos se realizaron durante la estancia del doctorando en el laboratorio del Dr. S. Sarafianos (Universidad de Missouri).

La reacción se desarrolló en una solución con 25 mM MOPS pH 7,0, 10 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA, 5 mM $MgCl_2$, 1 μ M de 2C y 0,1 μ M de un DNA con doble banda parcial (Figura 4.3) a 37°C, durante el tiempo indicado en cada caso en el apartado de Resultados. La mezcla también contuvo 20 μ M de un ácido nucleico de hebra sencilla capaz de hibridar con la hebra no marcada del sustrato de la reacción, actuando como captador en la reacción. Las reacciones se detuvieron con la adición del mismo volumen de tampón de carga para la electroforesis (100 mM EDTA, 0,2% SDS y 20% glicerol). La hebra sencilla liberada por la reacción y el ácido nucleico de doble banda

no separado fueron resueltos en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 6% con tampón TB, que fue sometido a 150 V durante 4 horas. El control de máxima separación del ácido nucleico fue el ácido nucleico de doble banda sometido a desnaturalización a 95°C durante 10 minutos y cargado inmediatamente en el gel. Los geles fueron escaneados con Typhoon FLA 9000 (GE Healthcare).

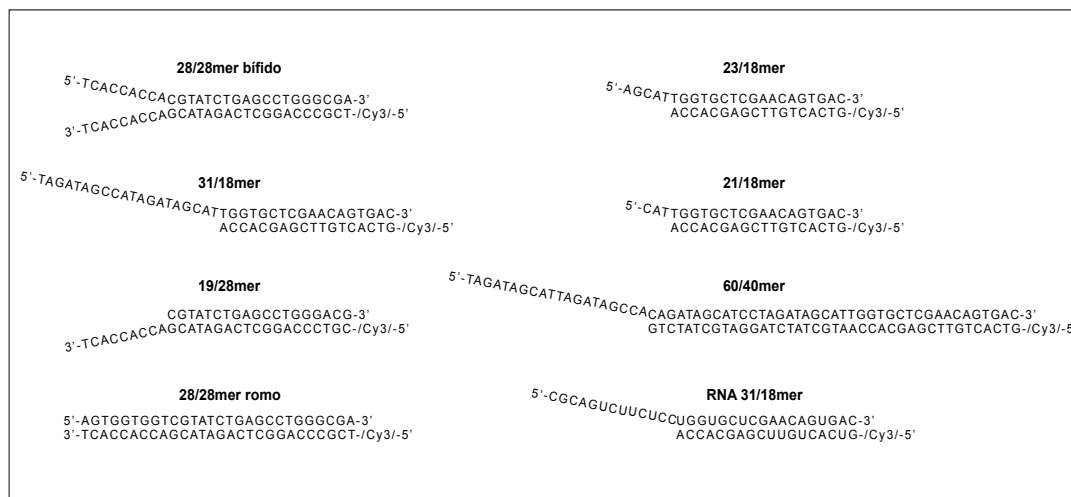


Figura 4.3 Secuencia de los complejos molde/cebador utilizados en los ensayos de actividad helicasa. Se indica la posición de la marca fluorescente Cy3 en el extremo 5' de una de las bandas.

4.25 Disoluciones y tampones utilizados

- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 6,8.
- Solución de Tripsina-EDTA: 0,5 mg/ml Tripsina (Sigma), 0,016% etilendiaminetetraacetato sódico (EDTA; Merck), 0,001% rojo fenol (Merck), diluidos en PBS.
- Solución de X-gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido 2% (X-gal, Roche) en dimetilformamida (Merck).
- Solución de IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosido en agua destilada.
- Tampón de resuspensión: 50 mM Tampón fosfato pH 7,8, 300 mM NaCl.
- Tampón A: 50mM Tampón fosfato pH 6,0, 500 mM NaCl.
- Tampón de diálisis: 50mM Tris HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM DTT y 1 mM EDTA.
- TAE: 40 mM Tris acetato, pH 8,3, 1 mM EDTA.

- TAE-EMSA: 120 mM Tris acetato, pH 7,5, 5 mM EDTA.
- TBE: 90 mM Tris base, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA.
- TB: 85 mM Tris HCl, 85 mM borato.
- TE: 10 mM Tris HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA.
- Tampón Tris-Tricina: 200 mM Tricina, 200 mM Tris, 0,5% SDS.

5 Resultados

5.1 Variantes del VFA resistentes a ribavirina

Al tratar el virus de la poliomielitis (PV) con el análogo de nucleósido ribavirina (R), se obtuvo una única sustitución de resistencia al mutágeno: la sustitución G64S en la proteína 3D (Pfeiffer & Kirkegaard, 2003; Vignuzzi *et al.*, 2006). Sin embargo, la sustitución G62S (equivalente en el VFA a G64S) nunca fue seleccionada en las poblaciones del VFA pasadas en presencia de R y, en su lugar, se seleccionó la sustitución de M296I (Sierra *et al.* 2007). Con el objeto de entender por qué la sustitución G62S no se seleccionó en el VFA, se construyeron los clones infecciosos con las sustituciones G62S, M296I y ambas G62S-M296I. Estos virus fueron pasados 5 veces en ausencia y presencia de ribavirina por triplicado y secuenciados. Los resultados mostraron inestabilidad genética del pMT28-3D(G62S), que revirtió en 2 de 3 de los pases seriados en ausencia de R, pero no en su presencia. Sin embargo, el pMT28-3D(G62S-M296I) permaneció estable tanto en presencia como en ausencia de R.

5.1.1 Cinética de crecimiento de poblaciones del VFA en ausencia y presencia de ribavirina

Los virus pMT28*wt*, pMT28-3D(M296I), pMT28-3D(G62S) y pMT28-3D(G62S-M296I) se utilizaron para infectar, a una m.d.i. de 0,05 PFU/célula, monocapas de células BHK-21, en presencia de 0, 200, 400 y 800 μ M R, y se determinó la infectividad de estos virus a distintos tiempos post-infección (Figura 5.1.1). Las cinéticas de producción de virus no mostraron diferencias importantes entre los 4 virus ensayados (Figura 5.1.1). Cuando se calculó la relación entre el título viral obtenido en ausencia de R con el título obtenido a distintas concentraciones de R a 10h y 24h post-infección (Figura 5.1.2), se observó una menor diferencia de títulos en el caso de todos los virus mutantes. Así, mientras que el virus *wt* presenta un título 300 veces inferior en presencia de la máxima concentración de R ensayada que en su ausencia,

los mutantes presentan una diferencia de entre 70 y 130 veces ($p < 0,01$ en todos los mutantes; ANOVA de un factor). Estos resultados sugieren una menor sensibilidad a la acción antiviral de la R de los virus pMT28-3D(M296I), pMT28-3D(G62S) y pMT28-3D(G62S-M296I) que del virus silvestre.

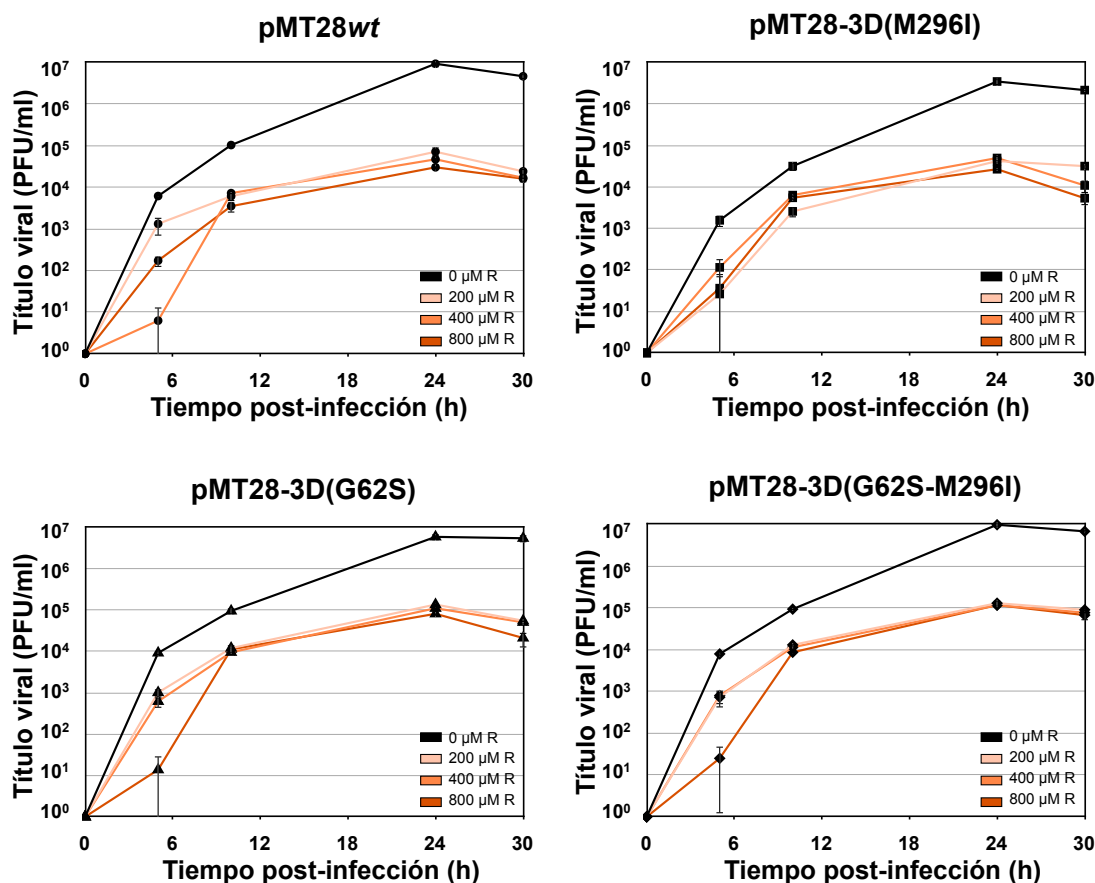


Figura 5.1.1 Cinéticas de producción viral a distintas concentraciones de R. Se muestran, para cada una de las poblaciones virales indicadas, los títulos virales (expresados en PFU/ml) determinados para el sobrenadante recogido a distintos tiempos post-infección. La línea negra es la cinética de producción viral en ausencia de R y las líneas con distintas tonalidades de naranja muestran la producción viral a las distintas concentraciones de R indicadas.

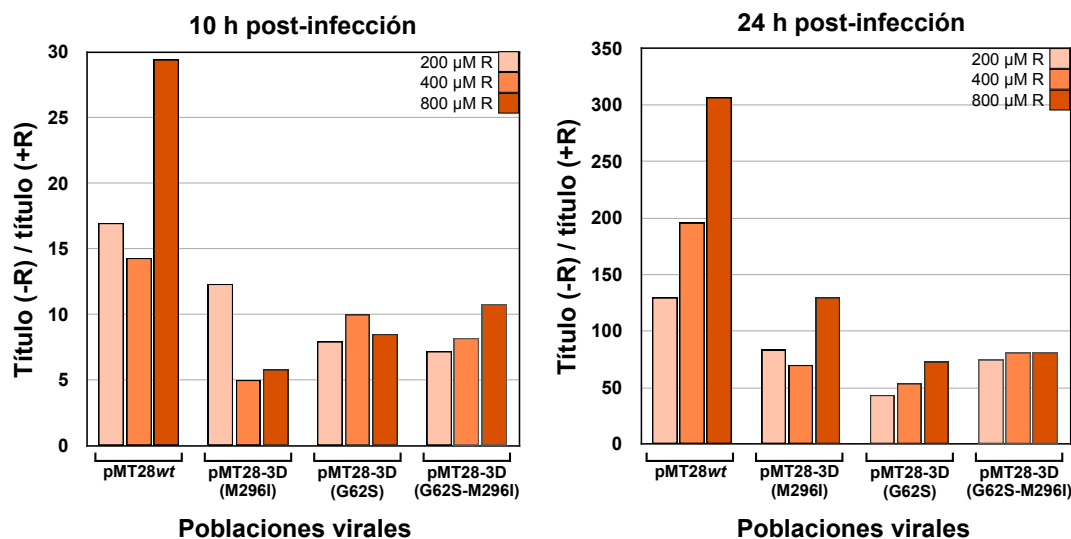
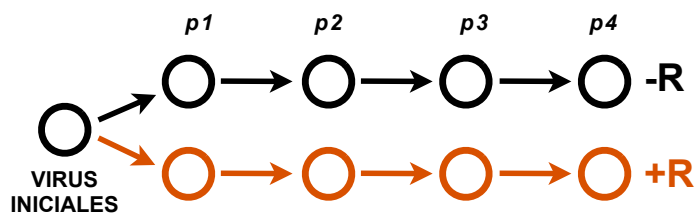


Figura 5.1.2 Efecto de la R sobre los mutantes del VFA con las sustituciones M296I y G62S en 3D. Se muestra la relación entre el título viral obtenido en la infección en ausencia de R por el título en presencia de la concentración indicada de R.

5.1.2 Aparición de mutaciones secundarias tras pases sucesivos del pMT28-3D(G62S-M296I)

Tras realizar las cinéticas de producción viral descritas en el apartado 5.1.1, se secuenciaron las distintas poblaciones de virus obtenidas (pase 1). La secuencia consenso de la región codificante de 3D permaneció sin cambios, excepto por la presencia de la sustitución F350L (mutación U7659A) en 3D, en mezcla con el residuo original, en las poblaciones del virus pMT28-3D(G62S-M296I) pasadas sin y con R (Figura 5.1.3). Para estudiar si esta nueva mutación se acabaría imponiendo en la población, los distintos virus fueron pasados en ausencia y presencia de 800 µM de R. Tras 3 pases adicionales (pase 4) se secuenciaron las regiones del OriC (cre), 2C y 3D de todas las poblaciones (Figura 5.1.3). La sustitución F350L se impuso en la población de pMT28-3D(G62S-M296I) pasada en ausencia de R, pero no en presencia. Adicionalmente, se impuso la sustitución I85V (mutación A4597G) en la proteína 2C en las poblaciones de pMT28-3D(G62S-M296I), tratadas y no tratadas con R.



Población (p1)	-R	+R	Población (p4)	-R	+R
pMT28wt	-	-	pMT28wt	-	-
pMT28-3D (M296I)	-	-	pMT28-3D (M296I)	-	-
pMT28-3D (G62S)	-	-	pMT28-3D (G62S)	-	-
pMT28-3D (G62S-M296I)	3D F350/L350	3D F350/L350	pMT28-3D (G62S-M296I)	3D L350 2C I85V	3D F350 2C I85V

Figura 5.1.3 Diagrama de pases y secuencias consenso. En la parte superior se esquematizan los pases a los que fueron sometidos los virus pMT28wt, pMT28-3D(M296I), pMT28-3D(G62S) y pMT28-3D(G62S-M296I) (virus iniciales) en ausencia (negro) y presencia de 800 μ M de R (naranja). En las tablas de la parte inferior se muestran las sustituciones aparecidas en las regiones de 2C y 3D en los pases señalados. Se indica la proteína y después el cambio de aminoácido. Las sustituciones que se encuentran en mezcla dentro de la población (40-60% de cada residuo) se muestran con una barra (/). La ausencia de cambios se representa con un guión (-).

5.1.3 Las polimerasas mutantes incorporan menos ribavirina que la polimerasa wt en ensayos bioquímicos

Con el fin de conocer los mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia a R observada, se expresaron y purificaron las 4 polimerasas: 3Dwt, 3D(M296I), 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I). Estas proteínas se usaron para resolver la estructura cristalográfica de cada una de ellas, así como para estudiar la incorporación de distintos nucleótidos sobre moldes heteropoliméricos.

Para determinar si las polimerasas pueden discriminar el RTP (ribavirina trifosfato) como sustrato de elongación de RNA en relación con GTP o ATP, se emplearon moldes/cebadores sym/sub (apartado 4.20 de Materiales y Métodos). La incorporación de GMP o AMP en primera posición del sym/sub CA o sym/sub UA, respectivamente, fue muy rápida, con aproximadamente el 30% del molde elongado en los primeros 20 segundos. A los 20 minutos de reacción con sym/sub CA, la incorporación de GMP fue 1,9 veces mayor que la de RMP para la 3Dwt, y de 5,2 a 18,9 veces mayor en el caso de las polimerasas mutantes (Figura 5.1.4). Las incorporaciones de AMP en ensayos similares, pero llevados a cabo con el sym/sub

UA, fueron de 7,3 veces la de RMP en el caso de 3Dwt y de 16,3 a 20,9 en el caso de las polimerasas mutantes (Figura 5.1.5). Estas diferencias fueron significativas ($p < 0,01$; ANOVA de un factor). Además de corroborar un descenso en la incorporación de RMP gracias a la sustitución M296I (Sierra *et al.*, 2007), estos experimentos demuestran que la sustitución G62S disminuye la capacidad de polimerización de 3D, y ayuda a discriminar RTP frente a GTP o ATP. Tomando 1200s como tiempo para el que se tienen valores comparativos, el descenso de la actividad de incorporación debida a G62S fue de 1,4 veces para GTP, 1,7 veces para GTP, 4,6 para RTP frente a C y 4,2 para RTP frente a U. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,01$; ANOVA de un factor).

5.1.4 La sustitución G62S provoca descensos de actividad enzimática de la polimerasa

Se han estudiado las actividades enzimáticas de polimerización y uridilación de VPg de 3D(M296I), 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I) en relación con 3Dwt. La actividad de polimerización relativa se calculó llevando a cabo ensayos de extensión de un molde poli(A)/oligo(dT) (apartado 4.20.1 de Materiales y Métodos). Se cuantificó mediante densitometría la cantidad de [α - 32 P] UTP incorporado y se relativizó a los datos de 3Dwt (Figura 5.1.6). Mientras que 3D(M296I) muestra una reducción de casi un 40% en actividad de polimerización, las polimerasas con la sustitución G62S apenas conservan un 30% de la actividad que presenta 3Dwt. Se ha observado un defecto en ambas actividades cuando la sustitución G62S está presente en la polimerasa. Estos datos enzimáticos se corresponden con datos de unión a RNA obtenidos en el laboratorio por la Dra. Macarena Sierra, que indicaron que las polimerasas con la sustitución G62S presentan defectos de unión a RNA (Ferrer-Orta *et al.*, 2010).

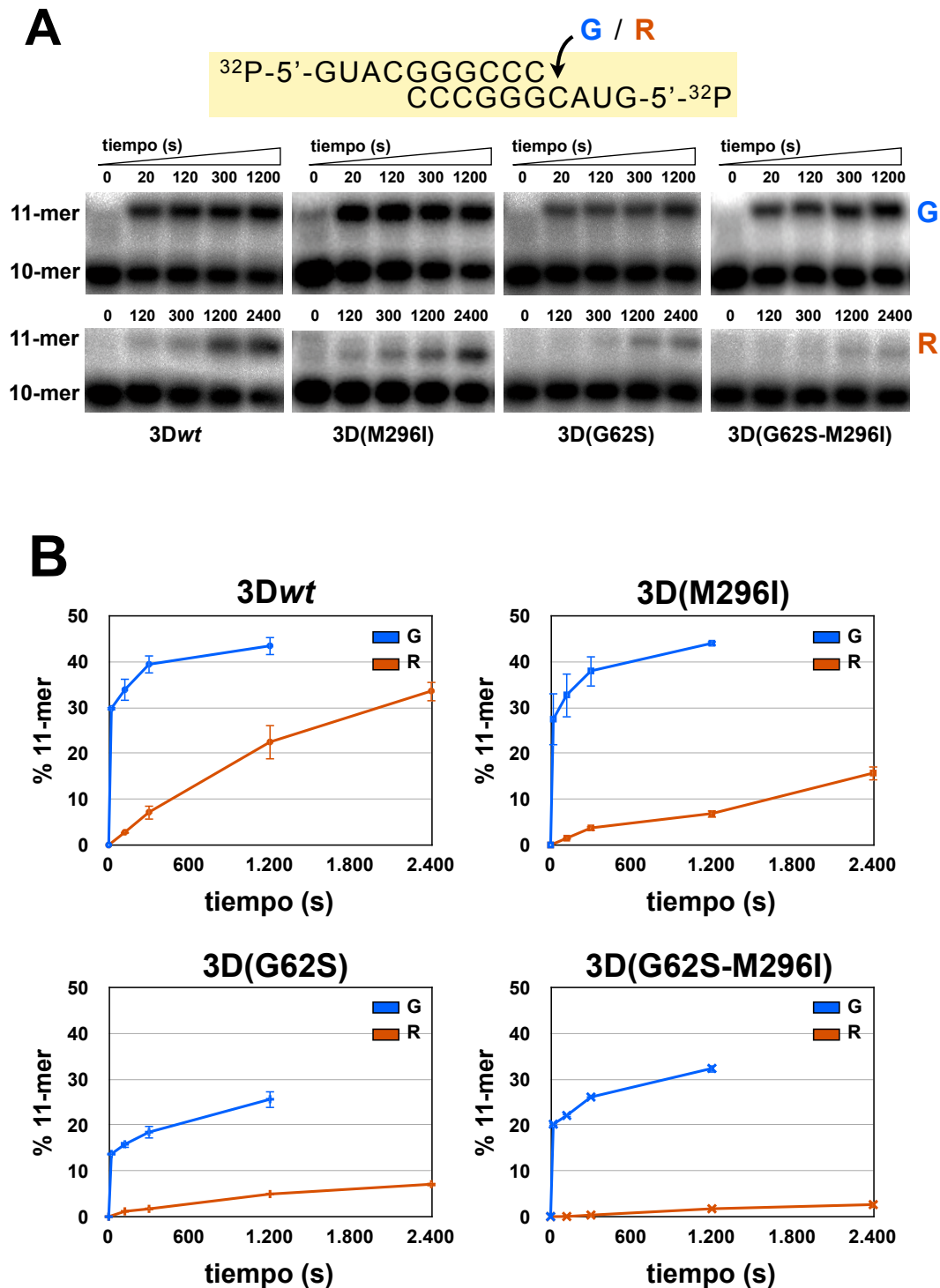


Figura 5.1.4 Incorporación de nucleótidos en el molde/cebador sym/sub CA por 3Dwt, 3D(M296I), 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I). (A) Análisis electroforético de los productos que resultan de la incorporación de GMP (G) o RMP (R) en el sym/sub CA (en caja amarilla) por las polimerasas indicadas. 10-mer hace referencia al RNA de 10 nucleótidos (sym/sub original) y 11-mer es el RNA producido al ser elongado por la polimerasa. (B) Porcentaje de sym/sub elongado en función del tiempo de reacción de las polimerasas indicadas. Las cinéticas de incorporación de GMP se representan en azul y las de incorporación de RMP se muestran en naranja.

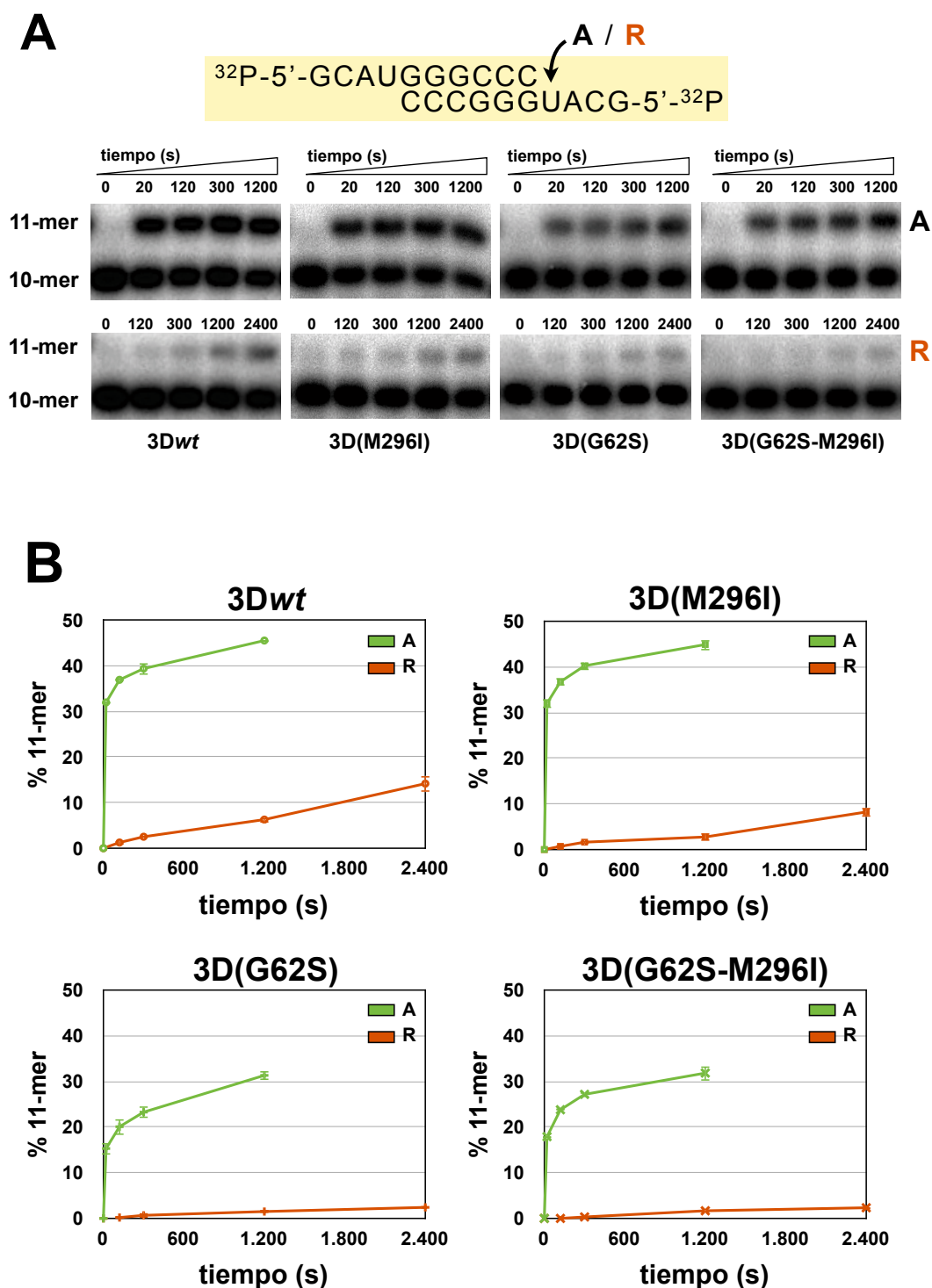


Figura 5.1.5 Incorporación de nucleótidos en el molde/cebador sym/sub UA por 3Dwt, 3D(M296I), 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I). (A) Análisis electroforético de los productos que resultan de la incorporación de AMP (G) o RMP (R) en el sym/sub UA (en caja amarilla) por las polimerasas indicadas. 10-mer hace referencia al RNA de 10 nucleótidos (sym/sub original) y 11-mer es el RNA producido al ser elongado por la polimerasa. (B) Porcentaje de sym/sub elongado en función del tiempo de reacción de las polimerasas indicadas. Las cinéticas de incorporación de AMP se representan en verde y las de incorporación de RMP se muestran en naranja.

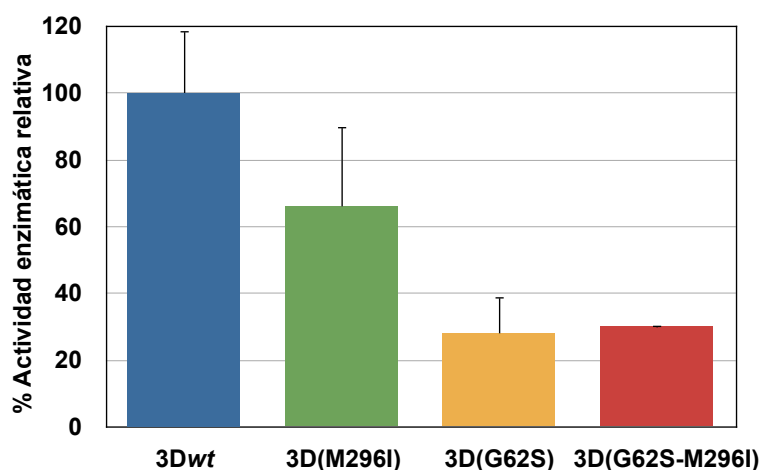


Figura 5.1.6 Ensayo de actividad de 3Dwt, 3D(M296I), 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I). Se muestra la actividad específica relativa a 3Dwt (azul) (5,3 pmol de UTP incorporado/min x μ g de enzima), determinada en ensayos de polimerización, empleando como molde una molécula de poli(A) y como cebador un oligo(dT) de 15 nucleótidos de longitud.

La actividad de uridilación de VPg se midió en 3 condiciones diferentes: en presencia de Mn^{++} y poli(A), en presencia de Mg^{++} , cre y 3CD y en presencia de Mn^{++} , cre y 3CD (apartado 4.20.2). Sorprendentemente, los resultados de los experimentos realizados en distintas condiciones difieren entre ellos. Mientras que las distintas polimerasas muestran niveles de uridilación similares entre sí cuando la reacción tiene lugar empleando poli(A) como molde de la reacción en presencia de Mn^{++} (Figura 5.1.7.A), los niveles de uridilación de las polimerasas con la sustitución G62S bajan drásticamente cuando lo que se emplea como molde de uridilación es el RNA cre (Figura 5.1.7.B) ($p < 0,01$; ANOVA de un factor). También se observa un descenso de actividad con RNA cre y 3CD sustituyendo el Mg^{++} por Mn^{++} , pero el descenso no es tan acusado como el anterior (Figura 5.1.7.C).

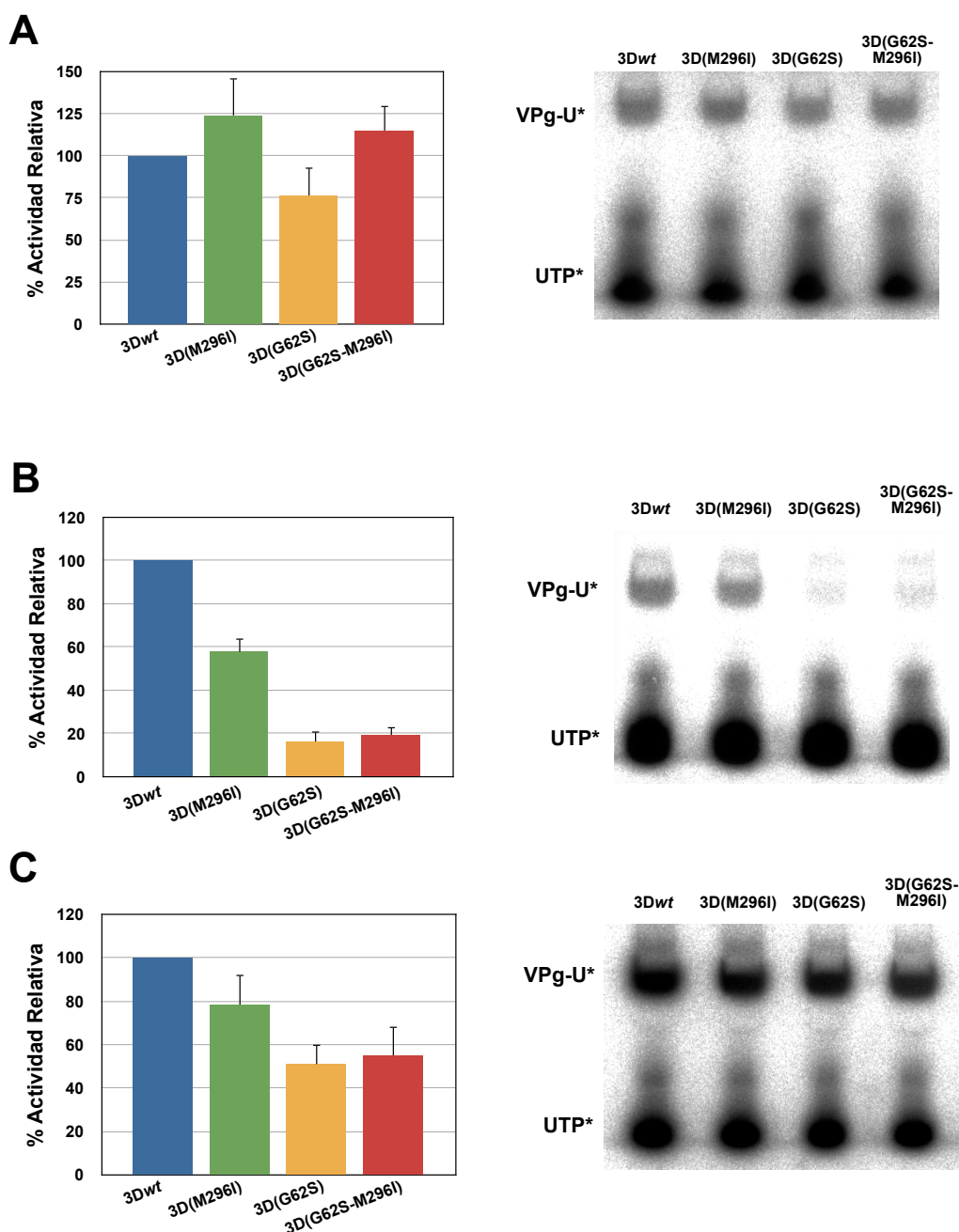


Figura 5.1.7 Uridilación de VPg por distintas polimerasas. (A) Ensayo de uridilación de VPg realizado en presencia de Mn^{++} y poli(A). En el panel de la izquierda se muestra la actividad de uridilación relativa a 3Dwt ($9,6 \times 10^{-2}$ pmol de UTP incorporado en VPg/min x μg de 3D). A la derecha se muestra uno de los geles de poliácridamida que fueron analizados para el cálculo de la uridilación, donde se observa una banda correspondiente a $[\alpha^{-32}P]UTP$ libre (UTP*) y una banda de $[\alpha^{-32}P]UTP$ unida a VPg-1 (VPg-U*). **(B)** Igual que en (A), pero el ensayo fue llevado a cabo en presencia de Mg^{++} , 3CD y cre, donde la actividad de 3Dwt es de $4,9 \times 10^{-2}$ pmol de UTP incorporado en VPg/min x μg de 3D. **(C)** Igual que (B), pero empleando como catión Mn^{++} en vez de Mg^{++} . La actividad de 3Dwt es de 1,2 pmol de UTP incorporado en VPg/min x μg de 3D. Las reacciones se efectuaron tal como se describe en 4.20.2, excepto que el tiempo del ensayo fue de 150 minutos. Los ensayos se realizaron por triplicado y se indican las desviaciones estándar.

5.2 Variantes de VFA seleccionados en presencia de 5-fluorouracilo

A pesar de haber propagado previamente el VFA en presencia 5-fluorouracilo (FU) en nuestro laboratorio, nunca se seleccionaron mutaciones de resistencia a este compuesto. Para tratar de obtener una población más adecuada para seleccionar un mutante de resistencia a FU, la Dra. Macarena Sierra pasó el VFA MARLS (Charpentier *et al.*, 1996) 30 veces en presencia de ribavirina (R) (Sierra *et al.*, 2007). Así obtuvo una población viral de alto *fitness*, con un espectro de mutantes expandido y cuya secuencia consenso incluía M296I, indicativa de selección por R. Tras 15 pases de esta población en ausencia o presencia de 50 ó 200 µg/ml de FU, la sustitución M296I en la proteína 3D revirtió y una nueva sustitución (V173I, resultante de la transición G7126A) en 3D dominó en la población tratada con 200 µg/ml de FU. Se decidió investigar dicha sustitución por su posible implicación en resistencia a FU.

5.2.1 Cinética de crecimiento de poblaciones del VFA en ausencia y presencia de 5-fluorouracilo

Para la caracterización biológica del virus con la sustitución V173I en la proteína 3D se construyó el clon infeccioso pMT28-3D(V173I) (apartado 4.14 de Materiales y Métodos). Además de la mutación G7126A, se introdujo la transversión silenciosa A7128C, que sirvió como marcador del mutante clonado (oligonucleótido descrito en la Tabla 4.5).

Los virus pMT28wt y pMT28-3D(V173I) se emplearon para infectar, a una m.d.i. de 0,05 PFU/célula, monocapas de células BHK-21 en presencia 0, 50, 100, 200 y 400 µg/ml de FU. Las cinéticas de producción de virus no mostraron diferencias significativas entre los virus ensayados (Figura 5.2.1).

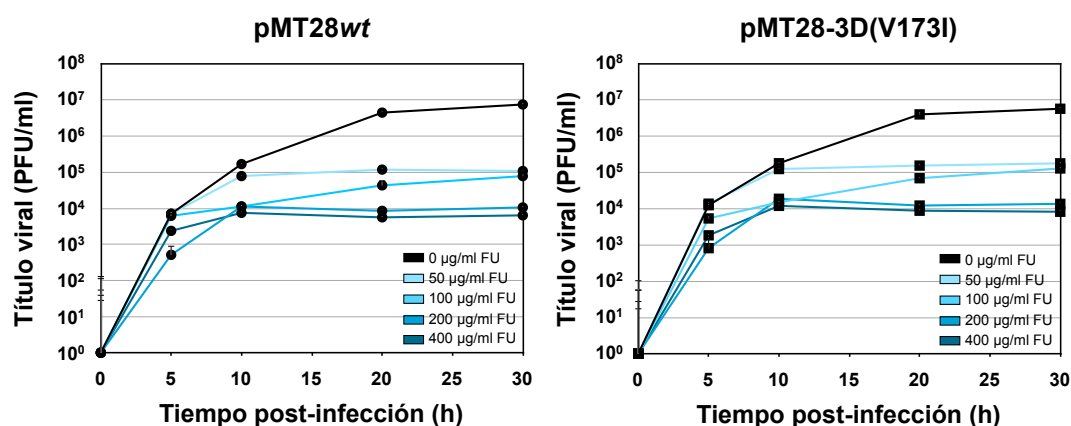


Figura 5.2.1 Cinéticas de producción viral a distintas concentraciones de FU. Se muestran para pMT28wt (panel de la izquierda) y pMT28-3D(V173I) (panel de la derecha) los títulos virales (expresados en PFU/ml) determinados para el sobrenadante recogido a los tiempos post-infección indicados en abscisa. La línea negra es la cinética de producción viral en ausencia de FU y las líneas con distintas tonalidades de azul muestran la producción viral en presencia de concentraciones crecientes de FU.

5.2.2 Pases seriados de pMT28wt y pMT28-3D(V173I) en presencia de 5-fluorouracilo

Para aumentar la posibilidad de detectar diferencias de producción de progenie entre pMT28wt y pMT28-3D(V173I), los virus se sometieron a infecciones sucesivas en ausencia o presencia de FU. Inicialmente se dieron 5 pases en ausencia o presencia de 100, 200 y 400 µg/ml de FU (Figura 5.2.2). Se determinó la secuencia consenso de la región 3D de las poblaciones generadas para comprobar la estabilidad de la sustitución V173I y descartar la aparición de nuevas mutaciones en la polimerasa. Las secuencias consenso de las poblaciones analizadas se mantuvieron inalteradas a lo largo de los 5 pases, tanto en ausencia como en presencia de FU.

Los pases en ausencia de FU indicaron que la producción del virus mutante es similar a la del virus silvestre (Figura 5.2.3). Se observó un descenso en título viral de aquellos virus pasados en presencia de FU, siendo mayor a mayores concentraciones de FU. Este descenso fue ligeramente menor en el caso del virus mutante ($p=0,001$; ANOVA de un factor).

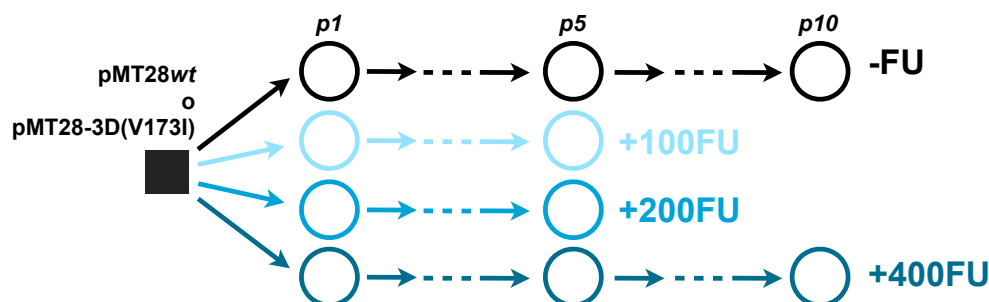


Figura 5.2.2 Diagrama de los pases seriados del VFA en ausencia y presencia de FU. Los clones infecciosos pMT28wt y pMT28-3D(V173I), representados con un cuadrado negro, fueron sometidos a 5 pases en células BHK-21 en paralelo en ausencia (negro) y presencia de 100, 200 y 400 µg/ml de FU (distintas tonalidades de azul). Las poblaciones virales se representan con círculos vacíos, y 'p' seguido de un número indica el número de pase. Se prosiguió con 5 pases más en ausencia y presencia de 400 µg/ml de FU.

Tras comprobar la estabilidad de la sustitución V173I, se prolongó el tratamiento con 400 µg/ml de FU durante 5 pases más (Figura 5.2.2). La secuencia consenso de la región 3D de las poblaciones resultantes permaneció sin alterar. No obstante, también se secuenciaron las regiones que comprenden el RNA cre, el péptido VPg y la región de 2C y se detectó la presencia de la sustitución I85V en la proteína 2C en las poblaciones pasadas en presencia de FU. Esta sustitución es la misma que se impuso al pasar pMT28-3D(G62S-M296I) en ausencia o presencia de R (apartado 5.1.2). De nuevo, la producción de pMT28wt y pMT28-3D(V173I) a lo largo de los pases en presencia de 400 µg/ml de FU no difirió significativamente (Figura 5.2.4).

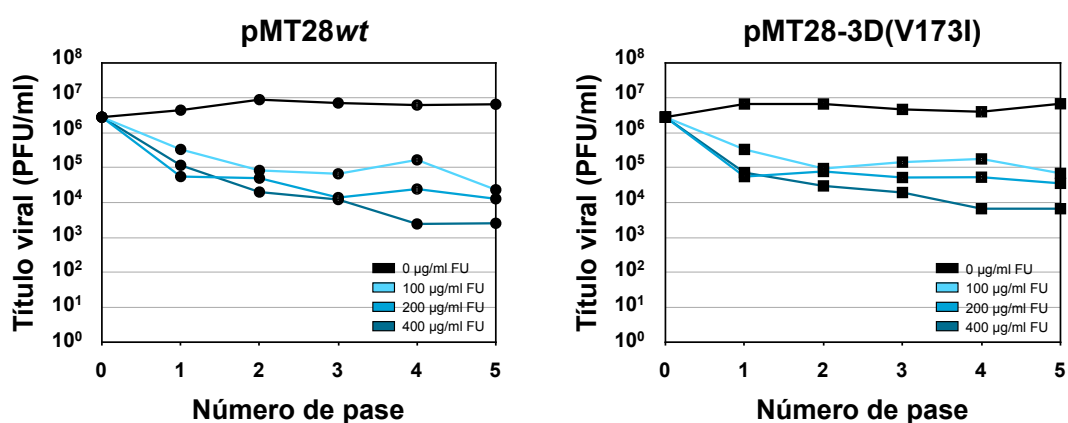


Figura 5.2.3 Infectividad de pMT28wt y pMT28-3D(V173I) pasados en ausencia o presencia de distintas concentraciones de FU. Se muestra la infectividad expresada en PFU/ml a lo largo de 5 pases de pMT28wt (panel de la izquierda) y pMT28-3D(V173I) (panel de la derecha). Los sobrenadantes se recogen a 24 post-adsorción. Las líneas negras muestran la infectividad de las poblaciones pasadas en ausencia de FU y en azul se representan las infectividades de las poblaciones virales pasadas en presencia de concentraciones crecientes de FU.

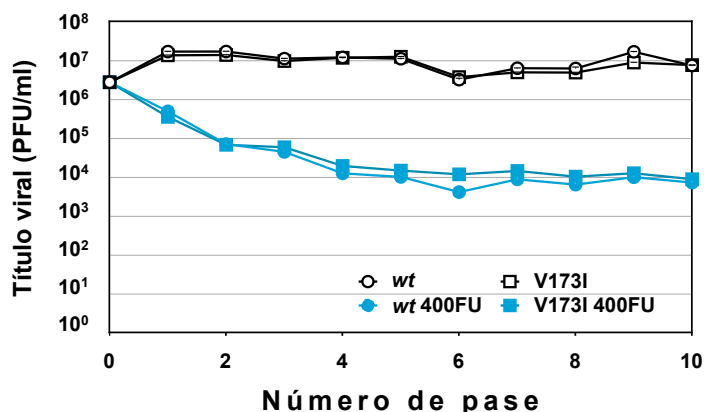


Figura 5.2.4 Infectividad de las poblaciones pMT28wt y pMT28-3D(V173I) pasadas en ausencia o presencia de 400 µg/ml FU. Se muestra la infectividad expresada en PFU/ml a lo largo de 10 pases de pMT28wt (círculos) y pMT28-3D(V173I) (cuadrados), abreviados como wt y V173I, respectivamente. Las líneas negras y símbolos vacíos muestran la infectividad de las poblaciones pasadas en ausencia de FU y en azul y símbolos llenos se representan las infectividades de las poblaciones virales pasadas en presencia de 400 µg/ml FU.

5.2.3 Niveles de RNA viral e infectividad específica de las poblaciones pMT28wt y pMT28-3D(V173I) pasadas en presencia o ausencia de 5-fluorouracilo

Con el objeto de determinar la infectividad específica [i.e. producción de partículas infecciosas (PFU) respecto al número total de genomas víricos en la población] de cada virus a lo largo de los pases, se midió la cantidad de RNA viral tanto en ausencia como en presencia de FU (Figura 5.2.5).

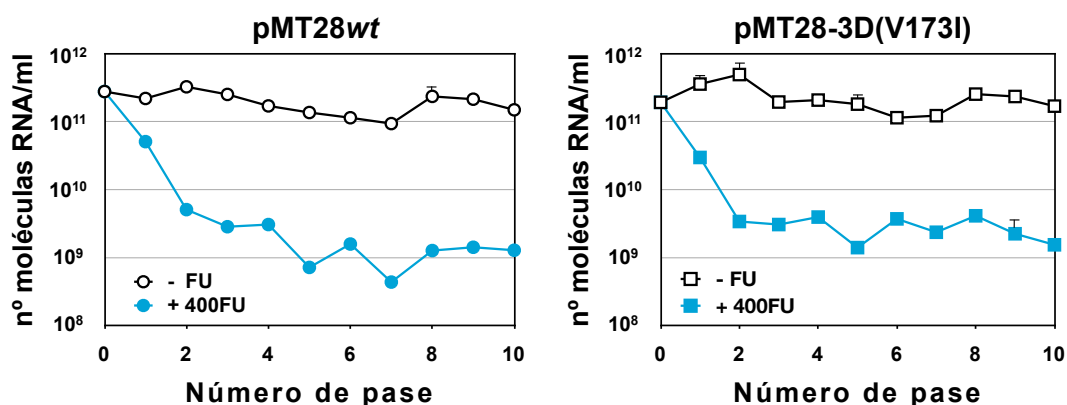


Figura 5.2.5 Niveles de RNA viral de las poblaciones pMT28wt y pMT28-3D(V173I) pasadas en ausencia o presencia de 400 µg/ml FU. Los niveles de RNA fueron determinados mediante RT-PCR a tiempo real a partir de extracciones del sobrenadante del medio de infección. Se muestra el número de moléculas de RNA/ml en el sobrenadante del medio de cultivo a lo largo de 10 pases de pMT28wt (panel de la izquierda) y pMT28-3D(V173I) (panel de la derecha). Las líneas negras y símbolos vacíos muestran los niveles de RNA de las poblaciones pasadas en ausencia de FU y en azul y símbolos llenos se representan los niveles de RNA de las poblaciones virales pasadas en presencia de 400 µg/ml FU.

Ambos virus mostraron un notable descenso en la cantidad de RNA al ser pasados en presencia de FU, siendo en ambos casos de hasta 2 órdenes de magnitud.

Los valores de infectividad específica son menores en aquellas poblaciones tratadas con FU ($p=0,002$; ANOVA de un factor), hecho característico de la mutagénesis letal (Domingo *et al.*, 2012). Sin embargo, las diferencias entre la infectividad específica de pMT28wt y pMT28-3D(V173I) son escasas y no se observa un descenso gradual a lo largo de los pases (Figura 5.2.6).

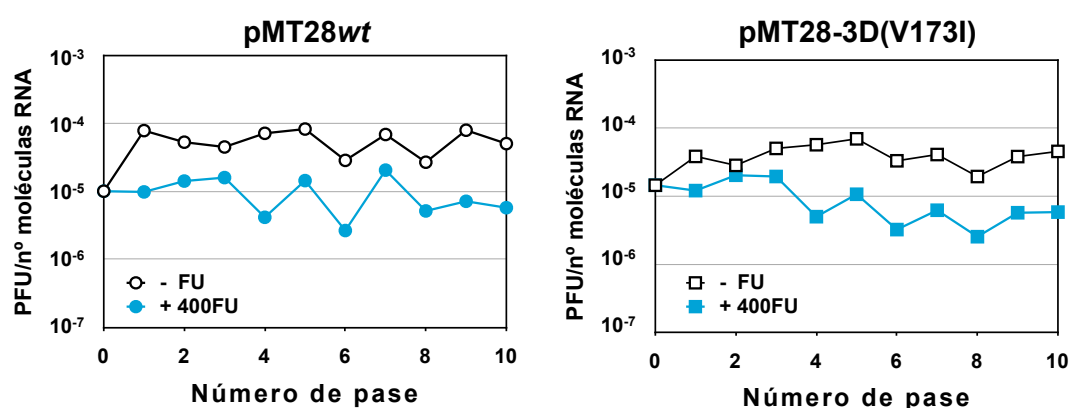


Figura 5.2.6 Infectividad específica de poblaciones virales derivadas de los clones infecciosos pMT28wt y pMT28-3D(V173I) pasadas en ausencia o presencia de 400 μ g/ml FU. Infectividad específica medida por PFU/n° de moléculas de RNA de las poblaciones virales pMT28wt (panel de la izquierda) y pMT28-3D(V173I) (panel de la derecha) pasadas 10 veces en ausencia (líneas negras; símbolos vacíos) o presencia de 400 μ g/ml de FU (líneas azules; símbolos llenos). Los valores de infectividad específica son el resultado de dividir los valores mostrados en la Figura 5.2.4 por los valores mostrados en la Figura 5.2.5.

5.2.4 Análisis del espectro de mutantes de poblaciones de pMT28wt y pMT28-3D(V173I)

Dada la similitud del virus mutante con el virus silvestre en cuanto a niveles de infectividad y de producción de RNA, se analizó la composición de las cuasiespecies generadas tras 10 pases en ausencia o presencia de FU, con el objetivo de desentrañar las posibles bases moleculares que expliquen la selección de la sustitución V173I en presencia de FU. Los resultados (Tabla 5.2.1) muestran aumentos de la frecuencia de mutación y de la entropía de Shannon como

consecuencia del tratamiento con FU. La frecuencia de mutación del mutante y la entropía de Shannon, son menores que las alcanzadas con el virus *wt* tanto en presencia como en ausencia de FU, aunque las diferencias en frecuencias de mutación no son significativas.

Población	Frecuencia de mutación	Entropía de Shannon	Nº de nucleótidos secuenciados (clones analizados)
pMT28wt p10	$5,9 \times 10^{-4}$ a	0,67	72610 (53)
pMT28wt + 400 µg/ml FU p10	$18,4 \times 10^{-4}$ b	1	52060 (38)
pMT28-3D(V173I) p10	$4,8 \times 10^{-4}$ a	0,48	68500 (50)
pMT28-3D(V173I) + 400 µg/ml FU p10	$17,5 \times 10^{-4}$ b	0,97	58910 (43)

Tabla 5.2.1. Complejidad de las cuasiespecies derivadas de pMT28wt y pMT28-3D(V173I) pasadas 10 veces en ausencia o presencia de FU. El estudio del espectro de mutantes de estas poblaciones se basa en el análisis de la secuencia de la región de 3D comprendida entre los nucleótidos 6610 y 7980 de las poblaciones indicadas, tal y como se describe en el apartado 4.12 de Materiales y Métodos. La frecuencia de mutación está expresada como el número total de mutaciones diferentes encontradas, respecto al número total de nucleótidos secuenciados. ^ap-valor = 0,44 (χ^2 con corrección de Yate); ^bp-valor = 0,76 (χ^2 con corrección de Yate). La entropía de Shannon fue calculada tal y como se describe en el apartado 4.12 de Materiales y Métodos.

El sesgo mutacional a favor de transiciones A→G y U→C se acentúa mediante el tratamiento con FU (Agudo *et al.*, 2009; Agudo *et al.*, 2008; Grande-Pérez *et al.*, 2002). Con pMT28wt se observó un aumento en la proporción de transiciones A→G y U→C (Tabla 5.2.2; Figura 5.2.7), pero la presencia de la sustitución V173I en la polimerasa del virus condujo a un descenso significativo de la proporción de transiciones A→G y U→C. Es decir, la presencia de la sustitución V173I en 3D modula la proporción de las distintas transiciones en el sentido de compensar el exceso de A→G y U→C que provoca el FU (ver Discusión, apartado 6.2.2).

Las mutaciones causantes de sustituciones encontradas en los espectros de mutantes de las distintas poblaciones pasadas en presencia de FU se hallan repartidas a lo largo de la región codificante de 3D, sin aparente acumulación de mutaciones en zonas concretas (Fig. 5.2.8; Tabla A.2 del Anexo). Asimismo, no se detectó una mayor preponderancia de sustituciones que podamos predecir como menos desfavorables en el virus mutante (Figura 5.2.8).

Población	Mutaciones						
	Transiciones				Transversiones	TOTAL	$\frac{[(A \rightarrow G) + (U \rightarrow C)]}{[(G \rightarrow A) + (C \rightarrow U)]}$
	A→G	G→A	U→C	C→U			
pMT28wt p10	16	6	13	4	3 x A→C 1 x U→G	43	2,9
pMT28wt + 400 µg/ml FU p10	35	8	46	7	0	96	5,4
pMT28- 3D(V173I) p10	12	3	13	3	2 x U→A	33	4,2
pMT28- 3D(V173I) + 400 µg/ml FU p10	29	13	46	13	1 x A→C 1 x U→G	103	1,7

Tabla 5.2.2. Tipos de mutaciones en los espectros de mutantes de pMT28wt y pMT28-3D(V173I) pasadas 10 veces en ausencia o presencia de FU. Las mutaciones son las presentes en los clones analizados en la Tabla 5.2.1 y están detalladas en la Tablas A.1 y A.2 del Anexo. Se muestra el número total de mutaciones aparecidas, así como la relación entre transiciones A→G + U→C y G→A + C→U.

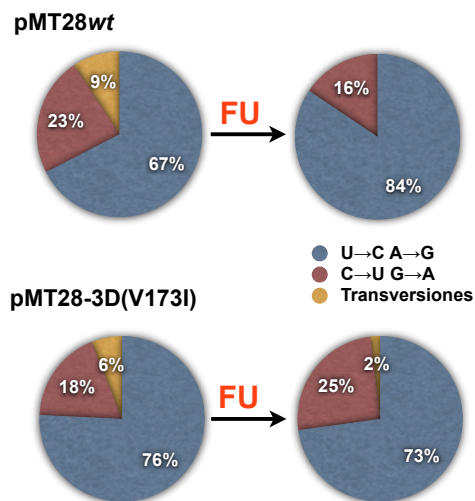


Figura 5.2.7 Proporción de los tipos de mutaciones encontradas en las poblaciones derivadas de pMT28wt y pMT28-3D(V173I) pasadas en ausencia o presencia de 400 µg/ml FU. Del total de mutaciones aparecidas en cada una de las poblaciones, se muestra el porcentaje de transiciones A→G y U→C (azul marengo), G→A y C→U (burdeos) y transversiones (amarillo). Mientras que el tratamiento con FU causó un aumento en el número de transiciones A→G y U→C de 67% a 84% con pMT28wt, el tratamiento con FU de pMT28-3D(V173I) produjo un descenso de 76% a 73% de transiciones A→G y U→C. Los cambios en el patrón de transiciones provocados por FU en el virus silvestre son estadísticamente significativos (p-valor=0,003; ANOVA de dos factores con interacción), mientras que el sesgo mutacional del virus mutante se mantuvo inalterado (p-valor=0,910; ANOVA de dos factores con interacción).

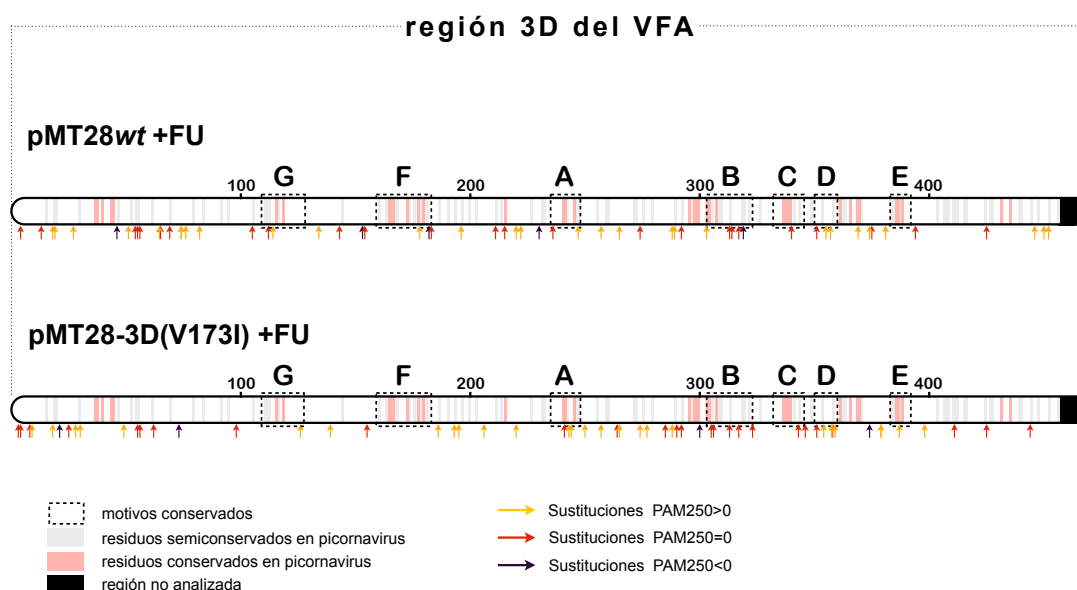


Figura 5.2.8 Distribución de las mutaciones no silenciosas encontradas en 3D de las poblaciones tratadas con FU. Esquema del gen que codifica la 3D del VFA, región que ha sido secuenciada para el análisis de los espectros de mutantes, donde se señalan los residuos que sufren cambios en las poblaciones tratadas con FU analizadas respecto a los clones infecciosos de partida. Los motivos conservados A, B, C, D, E, F y G de 3D están enmarcados en líneas discontinuas, los residuos semiconservados o conservados se indican en gris y salmón respectivamente, y cada mutación aparecida se marca con una flecha bajo el residuo correspondiente. El color de las flechas indica la probabilidad de cada sustitución, que está evaluada según la matriz de sustituciones PAM250 (Feng & Doolittle, 1996). Según la matriz PAM250, un valor positivo (flechas naranjas) indica una mayor probabilidad de presencia de lo que cabría esperar por fenómenos estocásticos y un valor negativo (flechas púrpuras) indica una menor probabilidad de presencia de lo que esperaríamos por fenómenos estocásticos.

5.2.5 Eficacia biológica (*fitness*) relativa de pMT28-3D(V173I) en ausencia y presencia de 5-fluorouracilo

La sustitución V173I en la proteína 3D fue seleccionada tras el tratamiento del VFA con FU y hemos observado una menor proporción de aquellos tipos de mutaciones provocados por la acción mutagénica del FU (apartado 5.2.4). Para saber si esta sustitución confiere una ventaja adaptativa frente a FU, el clon infeccioso pMT28-3D(V173I) fue sometido a competición con pMT28wt, con el fin de determinar la eficacia biológica del virus mutante en relación con el silvestre, en ausencia o presencia de FU. Las competiciones se realizaron durante 8 pases en presencia de 0, 100, 200 y 400 µg/ml de FU, siguiendo los procedimientos descritos en el apartado 4.11 de Materiales y Métodos.

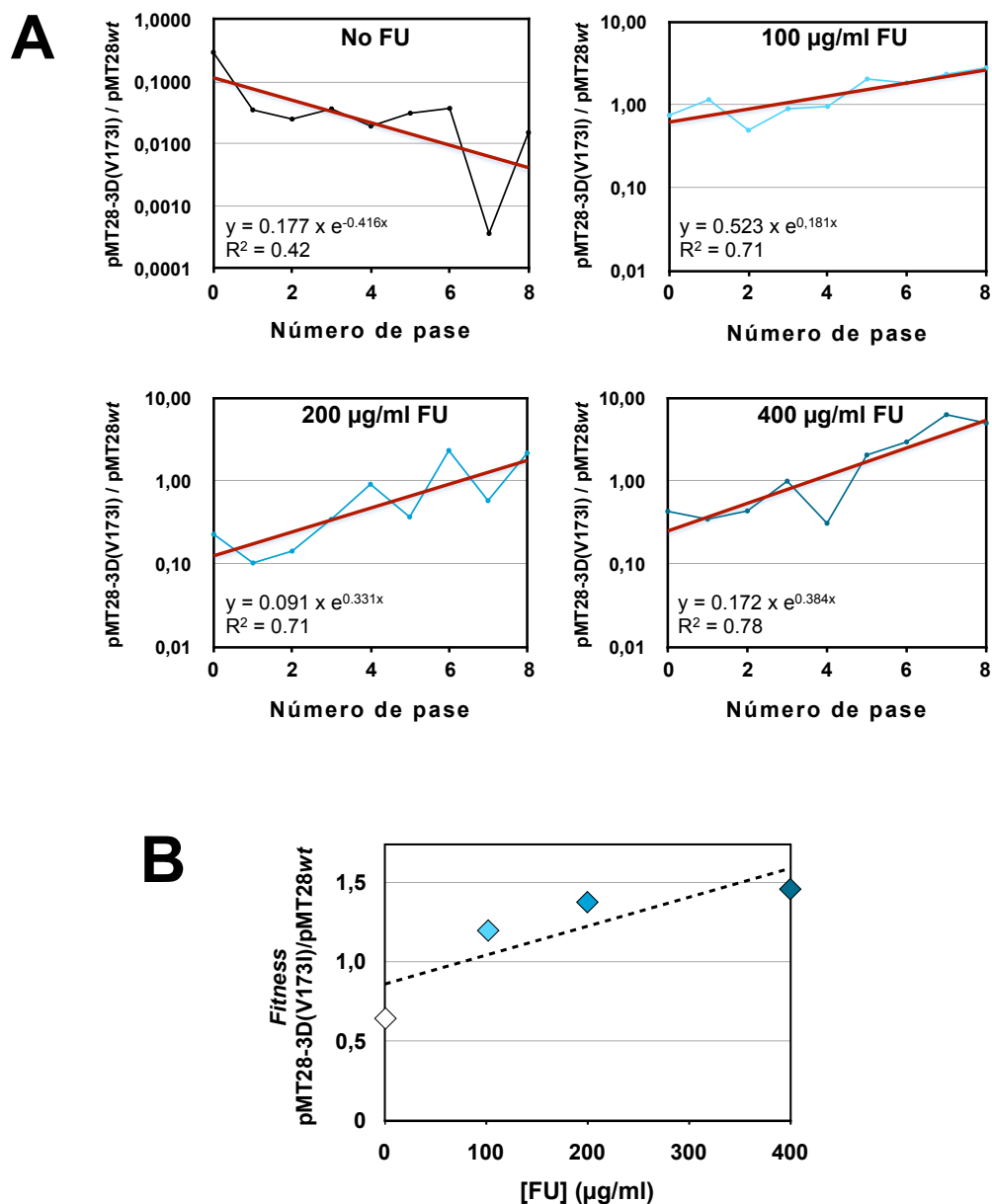


Figura 5.2.9 Eficacia biológica de pMT28-3D(V173I) relativa a pMT28wt en presencia de distintas concentraciones de FU. (A) Las competiciones tuvieron lugar al infectar células BHK-21 con una m.d.i. de 0,1 PFU/cél de una mezcla de los dos virus, con una proporción inicial de pMT28-3D(V173I) respecto a pMT28wt de entre 0,1 y 1. Se realizaron 8 pases tanto en ausencia de FU como en presencia de las distintas concentraciones de FU indicadas. La proporción de los dos virus en competición se determinó midiendo en cada pase las cantidades de RNA de cada tipo por RT-PCR a tiempo real con cebadores discriminatorios. Dichas proporciones fueron determinadas en cada pase, dispuestos en las gráficas que se muestran y los distintos puntos ajustados a la ecuación que se indica en cada panel. Los valores de eficacia biológica relativa de pMT28-3D(V173I) obtenidos son: **0,66** en ausencia de FU, **1,20** en presencia de 100 µg/ml FU, **1,39** en presencia de 200 µg/ml FU y **1,47** en presencia de 400 µg/ml FU. **(B)** Representación de los valores de *fitness* relativo en función de la concentración de FU.

Los resultados mostraron que la sustitución V173I provoca un coste de eficacia biológica en el VFA en ausencia de FU y que hay un aumento de eficacia biológica relativa del virus mutante dependiente de la concentración de FU (Figura 5.2.9). Estos datos sugieren que la sustitución V173I está implicada en la adaptación del VFA a FU.

5.2.6 Efecto de la frecuencia de mutación sobre adaptabilidad

Para determinar si el descenso en frecuencia de mutación observado en el virus mutante (Tabla 5.2.1) tiene algún impacto sobre la capacidad adaptativa del virus, se llevaron a cabo ensayos de inhibición con cloruro de guanidinio (GuH) (Pfeiffer *et al.* 2003). Estos experimentos nos permitieron comparar la frecuencia de generación estocástica de mutantes resistentes a GuH durante el transcurso de un pase citolítico del virus.

Como experimento control previo, se infectaron células BHK-21 con los clones biológicos pMT28*wt*, pMT28-2C(K169R) y pMT28-2C(M159L) (obtenidos como se detalla en el apartado 4.13 de Materiales y Métodos) tanto en ausencia como en presencia de 3 y 4 mM GuH. Los clones biológicos con las sustituciones K169R y M159L en la proteína 2C se obtuvieron de poblaciones tratadas con GuH que adquirieron resistencia a este compuesto (Pariente *et al.*, 2003). Los resultados de este ensayo previo muestran que, mientras que el virus silvestre pierde casi un 90% de infectividad al ser tratado con 3 mM GuH y el 100% con 4 mM, los virus resistentes a GuH no tienen descensos importantes de título viral (Figura 5.2.10.A).

El experimento realizado con dos clones biológicos de pMT28*wt* y dos de pMT28-3D(V173I) mostró, en términos generales, mayores pérdidas de producción viral del virus mutante en presencia de GuH (Figura 5.2.10.B) ($p=0,001$; ANOVA de un factor para las diferencias encontradas entre los clones de pMT28*wt* y pMT28-3D(V173I) a 48 horas con 3 mM de GuH). Este resultado puede ser indicativo de un aumento de la fidelidad de copia de 3D propiciado por la sustitución V173I, a pesar de que las diferencias en frecuencia de mutación entre el virus *wt* y el mutante no son significativas.

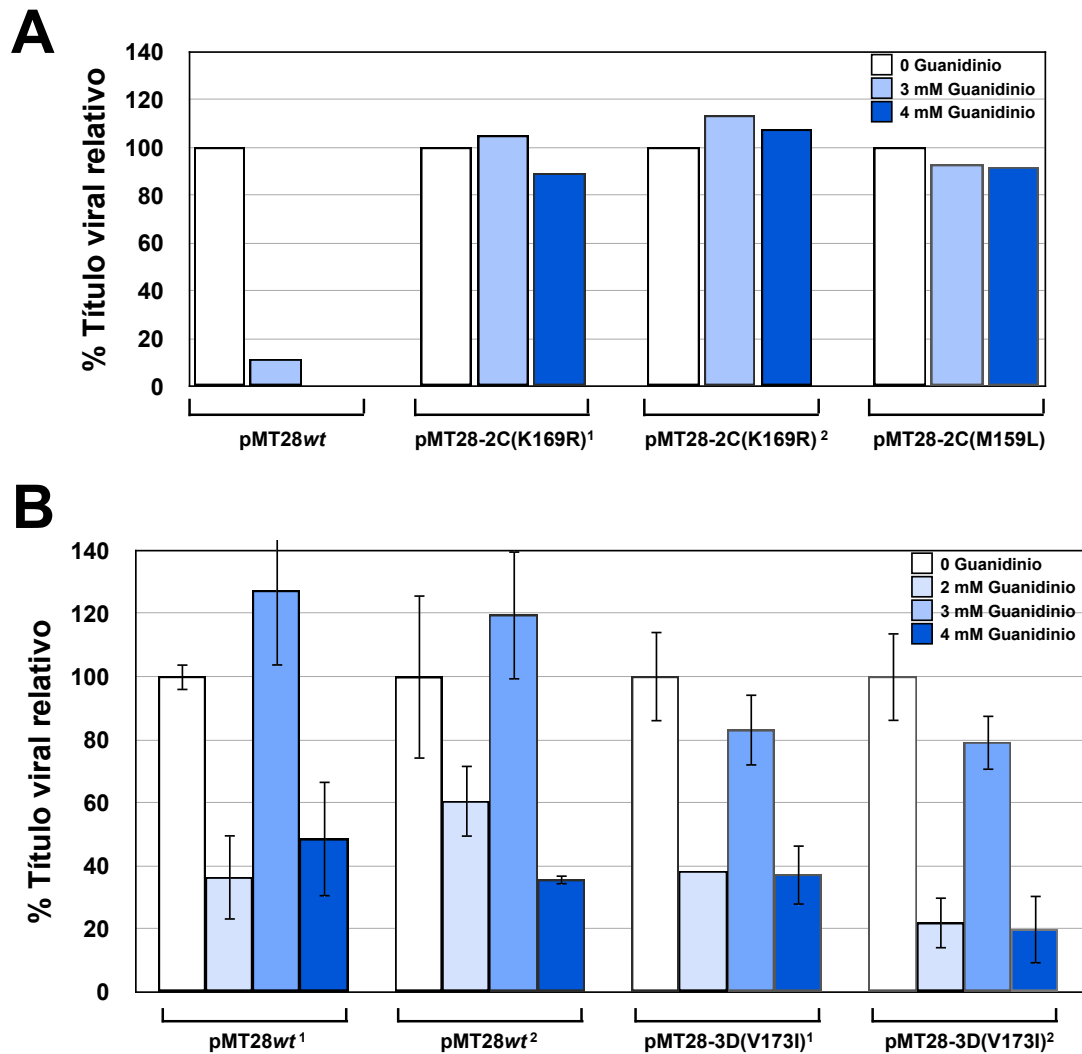


Figura 5.2.10 Crecimiento de clones biológicos en presencia de GuH. Los clones biológicos de los distintos virus se obtuvieron tras infectar células BHK-21 en medio semisólido, a una m.d.i. tal que se pudiesen obtener placas de lisis distinguibles. De las placas de lisis se extrajeron por succión los distintos clones y se diluyeron en DMEM. Los clones biológicos obtenidos se diluyeron de tal forma que se pudiera realizar una nueva titulación del virus en presencia de GuH. **(A)** Título viral relativo al título obtenido en ausencia de GuH de los clones biológicos pMT28wt, pMT28-2C(K169R) y pMT28-2C(M159L) tras 24 horas post-adsorción en presencia de 0, 3 ó 4 mM de GuH. **(B)** Título viral relativo al título obtenido en ausencia de GuH de los clones biológicos pMT28wt (dos clones biológicos diferentes) y pMT28-3D(V173I) (dos clones biológicos diferentes), tras 24 horas post-adsorción en presencia de 0 ó 2 mM de GuH, o tras 48 horas en presencia de 3 ó 4 mM de GuH.

Una diferencia importante entre el VFA con la sustitución V173I y el virus *wt* es la modulación de la proporción de transiciones A→G y U→C en el espectro de mutantes tras la replicación de los virus en presencia de FU. Estudios bioquímicos realizados anteriormente con polimerasas del VFA resistentes a R lograron elucidar el mecanismo molecular subyacente a esta resistencia a la mutagénesis letal (Sierra *et al.*, 2007; Arias *et al.*, 2008; Ferrer-Orta *et al.*, 2010; Agudo *et al.*, 2010). Estos estudios mostraron que la incorporación de R es menor por parte de las polimerasas mutantes que la enzima silvestre.

En el caso del VFA con la sustitución V173I era interesante abordar la respuesta adaptativa del VFA al FU mediante métodos bioquímicos, ya que plantea preguntas relevantes como son si el virus adquiere resistencia a la acción inhibitoria de FU o a su acción mutagénica o las bases moleculares del discernimiento entre U y FU (que difieren en solamente un átomo) y de la modulación del tipo de transiciones propiciada por la sustitución V173I. Para abordar estas preguntas, 3D*wt* y 3D(V173I) fueron expresadas, purificadas y estudiadas bioquímicamente.

5.2.7 Actividad enzimática de las polimerasas 3D*wt* y 3D(V173I)

La actividad de las enzimas purificadas se determinó mediante un ensayo estándar de síntesis de poli(U) (apartado 4.20.1 de Materiales y Métodos). El ensayo se realizó por quintuplicado y los resultados fueron normalizados en función de la actividad de 3D*wt* ($100 \pm 8\%$), siendo la actividad enzimática de 3D(V173I) el $81 \pm 6\%$ respecto a 3D*wt*. Estos resultados indican que la sustitución V173I no produce en 3D descensos importantes en la actividad de polimerización de RNA en el ensayo estándar.

5.2.8 Unión de las polimerasas 3D*wt* y 3D(V173I) al RNA

Para determinar si la sustitución V173I afecta a la unión de la 3D al RNA se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel con sym/sub UG (apartado 4.22 de Materiales y Métodos) y cantidades crecientes de 3D (apartado 4.22). Los resultados (Figura 5.2.11) muestran que 3D(V173I) produce un retardo de RNA ligeramente inferior a 3D*wt*, sugiriendo una menor unión al RNA ($p=0,002$; ANOVA de dos factores).

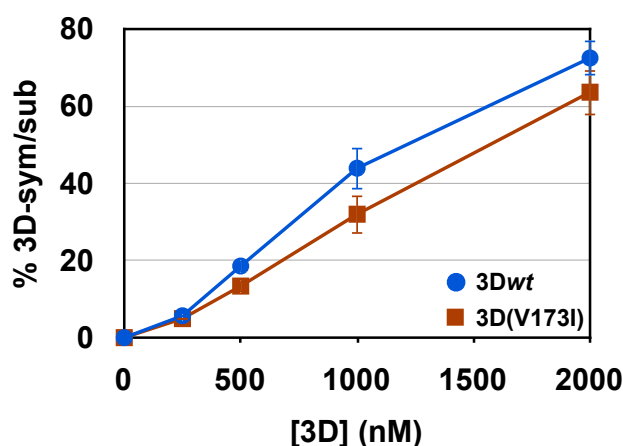
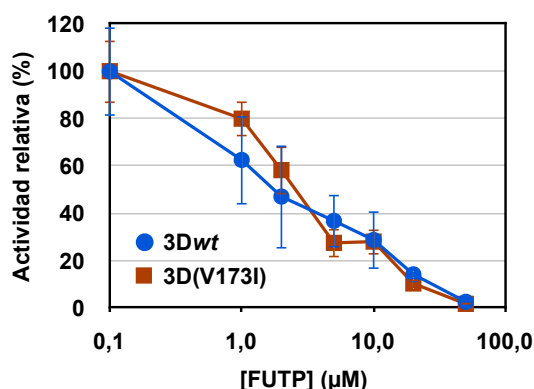
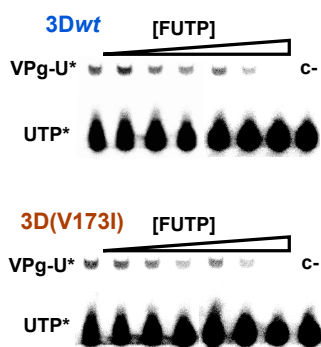


Figura 5.2.11 Análisis de la unión a RNA de 3Dwt y 3D(V173I) mediante retardo en gel. Representación del porcentaje de sym/sub UG marcado (285 nM) que fue retardado en función de la concentración de 3Dwt (círculos azules) y 3D(V173I) (cuadrados burdeos) en un gel de poliacrilamida al 4%.

5.2.9 Influencia de la sustitución V173I en la inhibición por FUTP de la uridilación de VPg

El inicio de la replicación del RNA de picornavirus tiene lugar con la uridilación de Tyr-3 del péptido VPg (3B) (apartado 2.4 de Introducción) (Ferrer-Orta *et al.*, 2006a; Rozovics & Semler, 2010; Wimmer & Paul, 2010). El 5-fluorouracilo trifosfato (FUTP), además de ser un agente mutagénico para el VFA, actúa como inhibidor competitivo de la uridilación de VPg, ya que forma un enlace covalente entre FUMP y Tyr-3 de VPg, impidiendo así la elongación del RNA viral (Agudo *et al.*, 2008) (apartado 2.4 de Introducción). Por tanto, era importante discernir entre la actividad inhibitoria y la acción mutagénica del FU para poder comprender la ventaja selectiva conferida por la sustitución V173I en aquellas poblaciones virales tratadas con FU. Para ello se llevaron a cabo experimentos de inhibición por FUTP del péptido VPg con las polimerasa purificadas. La capacidad de 3Dwt y 3D(V173I) de uridilar VPg-1 en presencia de FUTP fue determinada en presencia de Mn^{++} y poli(A) y en presencia de Mg^{++} , RNA cre y 3CD. Los resultados de estos ensayos no revelaron diferencias significativas entre las dos enzimas (Figura 5.2.12). Por consiguiente y tal como sugieren los datos de cultivos celulares, la sustitución V173I parece aportar una ventaja en el reconocimiento de FU como sustrato de la elongación del RNA, pero no en la iniciación de la síntesis de RNA.

A



B

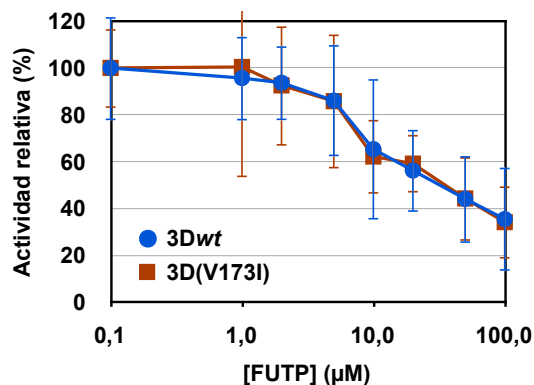
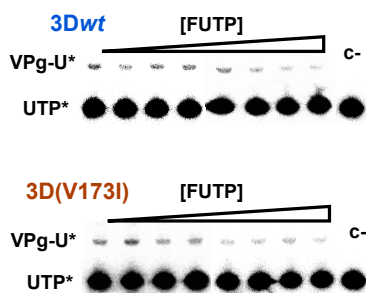


Figura 5.2.12 Inhibición por FUTP de la uridilación de VPg de 3Dwt y 3D(V173I). (A) A la izquierda se muestran los geles SDS-PAGE (12% de acrilamida) con los productos de la reacción de incorporación de $[\alpha\text{-P}^{32}]\text{-UTP}$ en el péptido VPg-1 por 3Dwt y 3D(V173I) en presencia de Mn^{++} y Poli(A), con concentraciones crecientes de FUTP. La muestra cargada en el primer carril no contuvo FUTP y la última sirvió de control negativo, al carecer de la polimerasa (c-). A la derecha se muestra la uridilación en función de la concentración de FUTP relativa a la uridilación observada en ausencia de FUTP para 3Dwt (círculos azules) y para 3D(V173I) (cuadrados burdeos). (B) Mismo experimento y datos que en (A) pero con la reacción de uridilación de VPg-1 en presencia de Mg^{++} , 3CD y cre.

5.2.10 Cinéticas de incorporación de nucleótidos correctos por 3Dwt y 3D(V173I) en estado pre-estacionario

Con el objetivo de determinar las propiedades cinéticas de incorporación de nucleótidos por parte de las polimerasas *wt* y mutante, se realizaron ensayos de

extensión de moldes heteropoliméricos en condiciones de estado pre-estacionario. Para la ejecución de estos experimentos se usó la técnica de *rapid quench flow*, tal y como se expone en el apartado 4.23.2 de Materiales y Métodos. Se midió la incorporación de un nucleótido sobre un complejo molde-cebador de tipo sym/sub adecuado para cada nucleótido.

Los resultados de incorporación de cada uno de los nucleótidos para las polimerasas *wt* y mutante se puede observar en las Figuras 5.2.13, 5.2.14, 5.2.15 y 5.2.16. Los parámetros cinéticos se resumen en la tabla 5.2.3. Se ha observado una disminución de la eficiencia de incorporación correcta de purinas en 3D(V173I), siendo la incorporación de A frente a U 3 veces menor que en 3D*wt* y la incorporación de G frente a C casi la mitad que 3D*wt* (Tabla 5.2.3). Aún así, la incorporación de U frente a A es más eficiente en la polimerasa mutante, mientras que la incorporación de C frente a G no está afectada por la sustitución V173I.

5.2.11 Cinéticas de incorporación de FUMP por 3D*wt* y 3D(V173I)

Se realizaron experimentos similares a los descritos en el apartado anterior, empleando FUTP como sustrato de la reacción de polimerización. Para comparar los parámetros cinéticos de incorporación de UMP o FUMP por las dos polimerasas se usó el sym/sub-UA. Los resultados muestran que, mientras que 3D*wt* incorpora UMP (Figura 5.2.15) y FUMP (Figura 5.2.17) con una eficiencia similar (Tabla 5.2.3), 3D(V173I) muestra un incremento de la eficiencia de incorporación de UMP (Figura 5.2.15; Tabla 5.2.3) y un descenso en la eficiencia de incorporación de FUMP (Figura 5.2.17; Tabla 5.2.3). Las diferencias entre ambas polimerasas quedan reflejadas en las diferencias en selectividad de FUTP respecto a UTP, definiendo selectividad como el cociente entre la eficiencia de incorporación del nucleótido correcto (UTP en este caso) y la eficiencia de incorporación del nucleótido incorrecto (FUTP). La selectividad de 3D(V173I) para incorporar UMP en lugar de FUMP es 6 veces mayor que la de 3D*wt*.

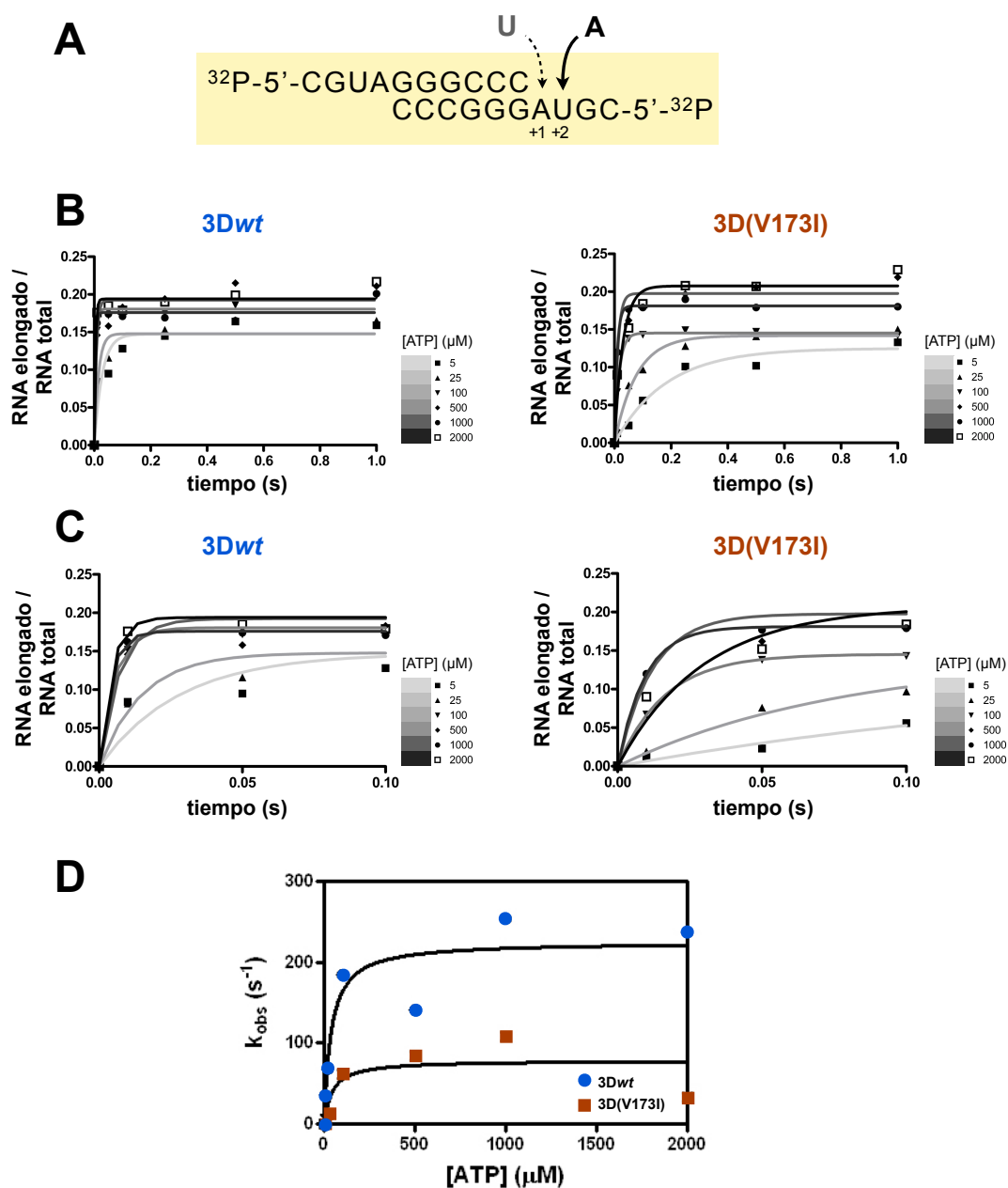


Figura 5.2.13 Cinética de incorporación de AMP sobre sym/sub AU en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt y 3D(V173I). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. (B) Cinética de incorporación de AMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 0,5 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub AU marcado e hibridado y 10 μM de UTP, para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de U en primera posición. El producto de la preincubación se mezcló con ATP empleando el aparato de *quench-flow* y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Ampliación de las gráficas enseñadas en B al intervalo de incorporación de 0,0 a 0,1 segundos. (D) Representación de los valores de k_{obs} de 3Dwt (círculos azules) y 3D(V173I) (cuadrados burdeos) obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) y (C) a una curva exponencial, en función de la concentración de ATP. Los puntos de cada curva se ajustaron a una hipérbola, de la que se obtienen los parámetros cinéticos resumidos en la Tabla 5.2.3.

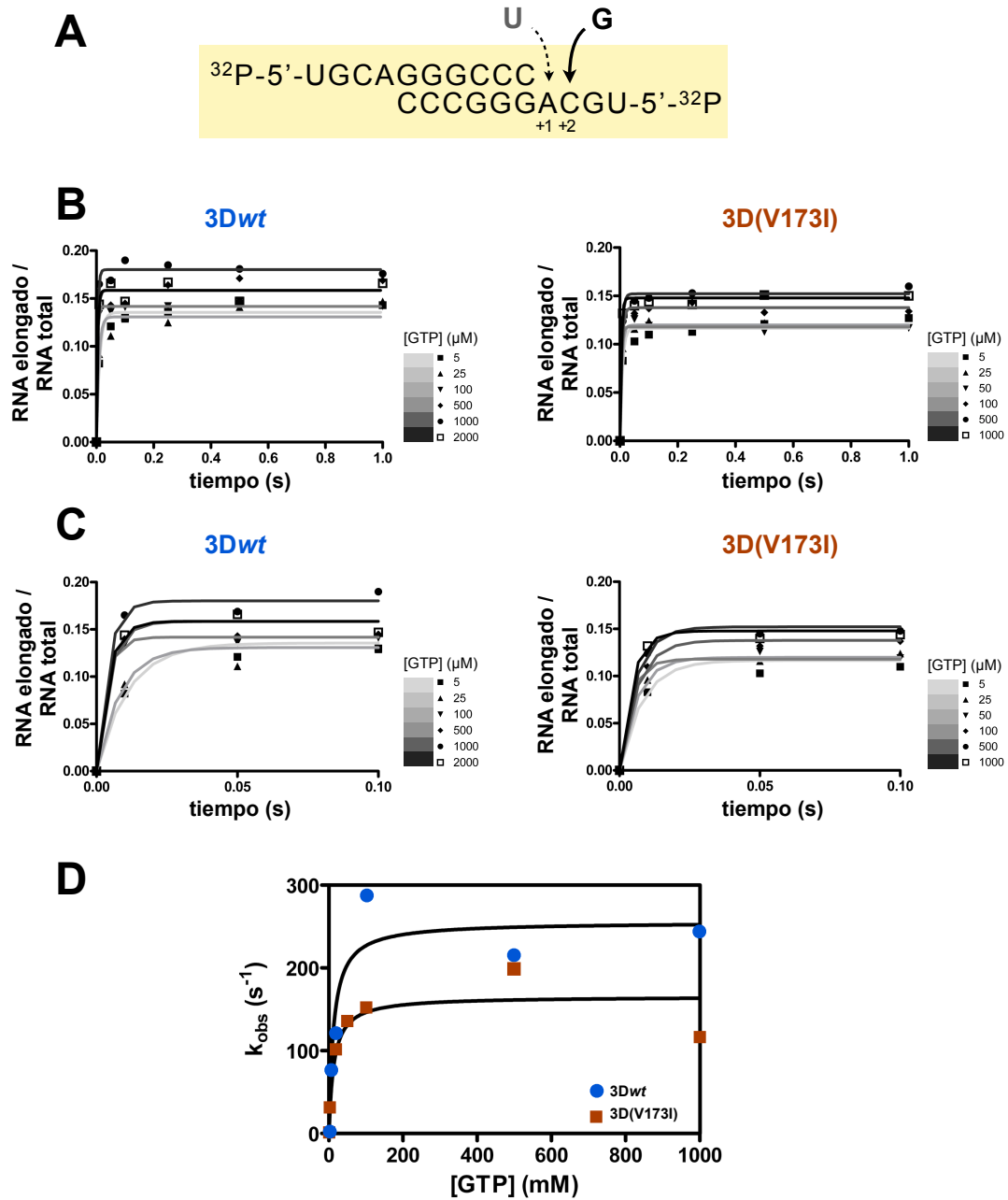


Figura 5.2.14 Cinética de incorporación de GMP sobre sym/sub AC en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt y 3D(V173I). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. (B) Cinética de incorporación de GMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 0,5 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub AC marcado e hibridado y 10 μM de UTP, para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de U en primera posición. El producto de la preincubación se mezcló con GTP empleando el aparato de *quench-flow* y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Ampliación de las gráficas enseñadas en B al intervalo de incorporación de 0,0 a 0,1 segundos. (D) Representación de los valores de k_{obs} de 3Dwt (círculos azules) y 3D(V173I) (cuadrados naranjas) obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) y (C) a una curva exponencial, en función de la concentración de GTP. Los puntos de cada curva se ajustaron a una hipérbola, de la que se obtienen los parámetros cinéticos resumidos en la Tabla 5.2.3.

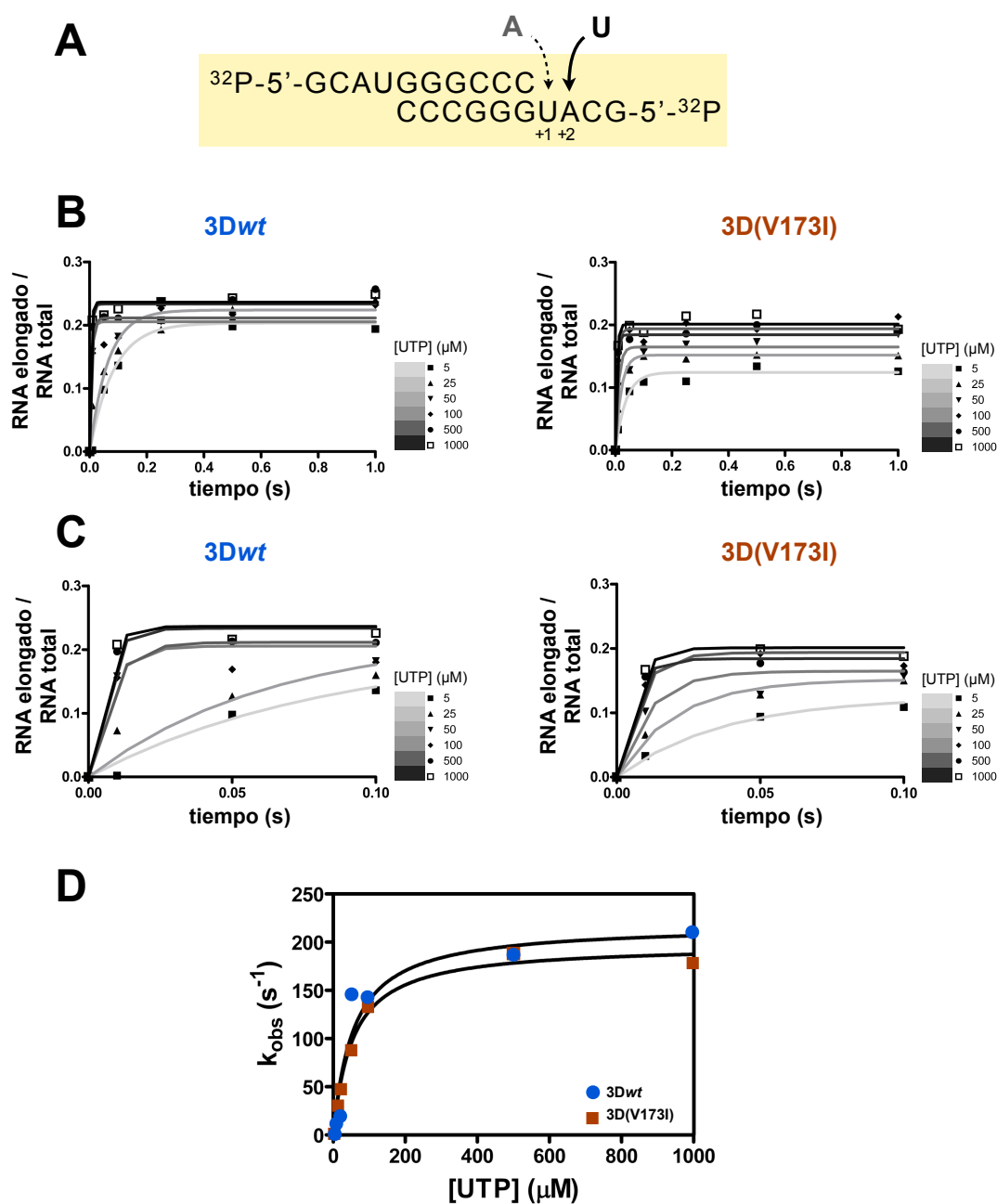


Figura 5.2.15 Cinética de incorporación de UMP sobre sym/sub UA en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt y 3D(V173I). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. (B) Cinética de incorporación de UMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 0,5 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub UA marcado e hibridado y 10 μM de ATP, para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de A en primera posición. El producto de la preincubación se mezcló con UTP empleando el aparato de *quench-flow* y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Ampliación de las gráficas enseñadas en B al intervalo de incorporación de 0,0 a 0,1 segundos. (D) Representación de los valores de k_{obs} de 3Dwt (círculos azules) y 3D(V173I) (cuadrados burdeos) obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) y (C) a una curva exponencial, en función de la concentración de UTP. Los puntos de cada curva se ajustaron a una hipérbola, de la que se obtienen los parámetros cinéticos resumidos en la Tabla 5.2.3.

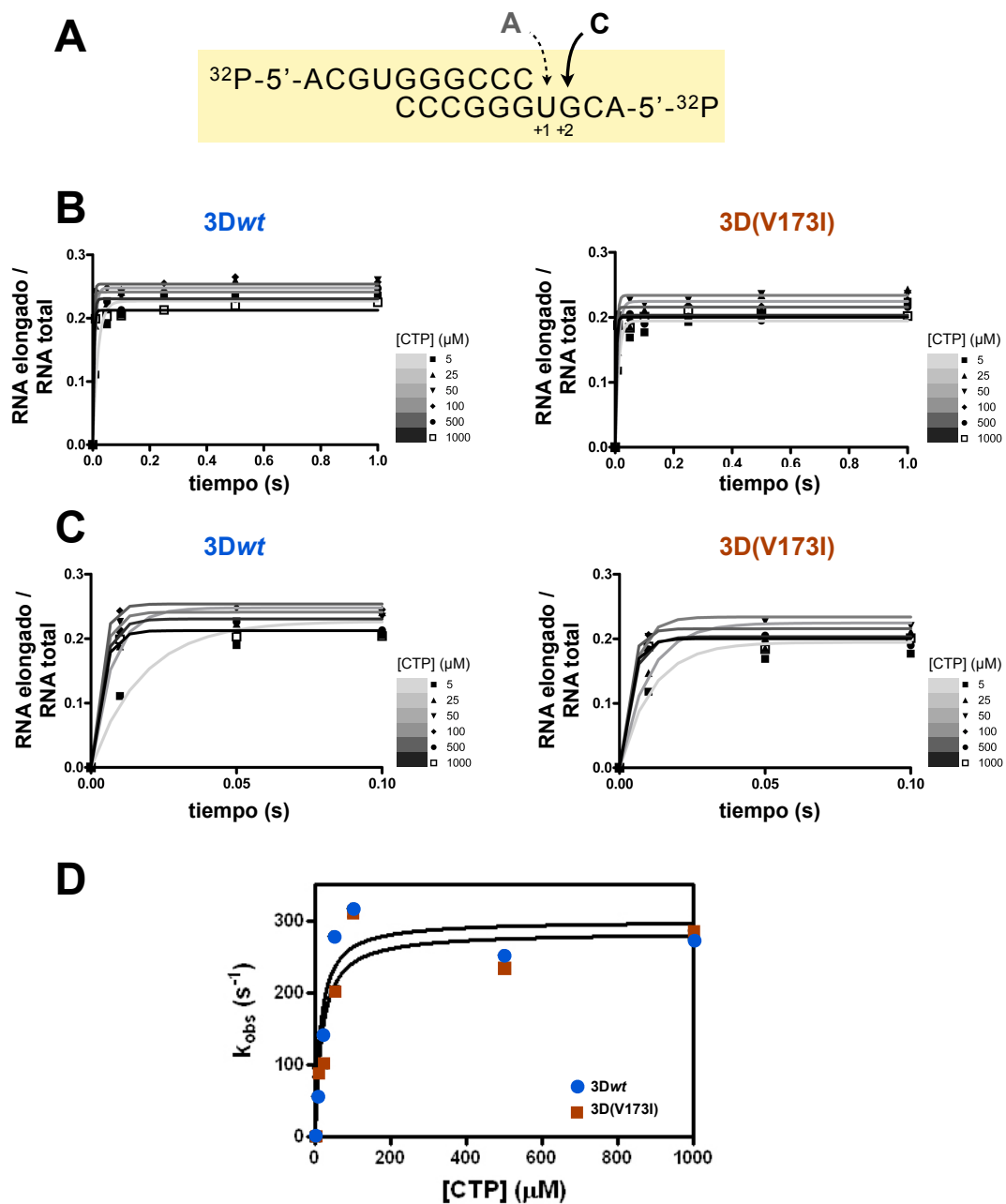


Figura 5.2.16 Cinética de incorporación de CMP sobre sym/sub UG en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt y 3D(V173I). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. (B) Cinética de incorporación de CMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 0,5 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub UG marcado e hibridado y 10 μM de ATP, para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de A en primera posición. El producto de la preincubación se mezcló con CTP empleando el aparato de *quench-flow* y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Ampliación de las gráficas enseñadas en B al intervalo de incorporación de 0,0 a 0,1 segundos. (D) Representación de los valores de k_{obs} de 3Dwt (círculos azules) y 3D(V173I) (cuadrados burdeos) obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) y (C) a una curva exponencial, en función de la concentración de CTP. Los puntos de cada curva se ajustaron a una hipérbola, de la que se obtienen los parámetros cinéticos resumidos en la Tabla 5.2.3.

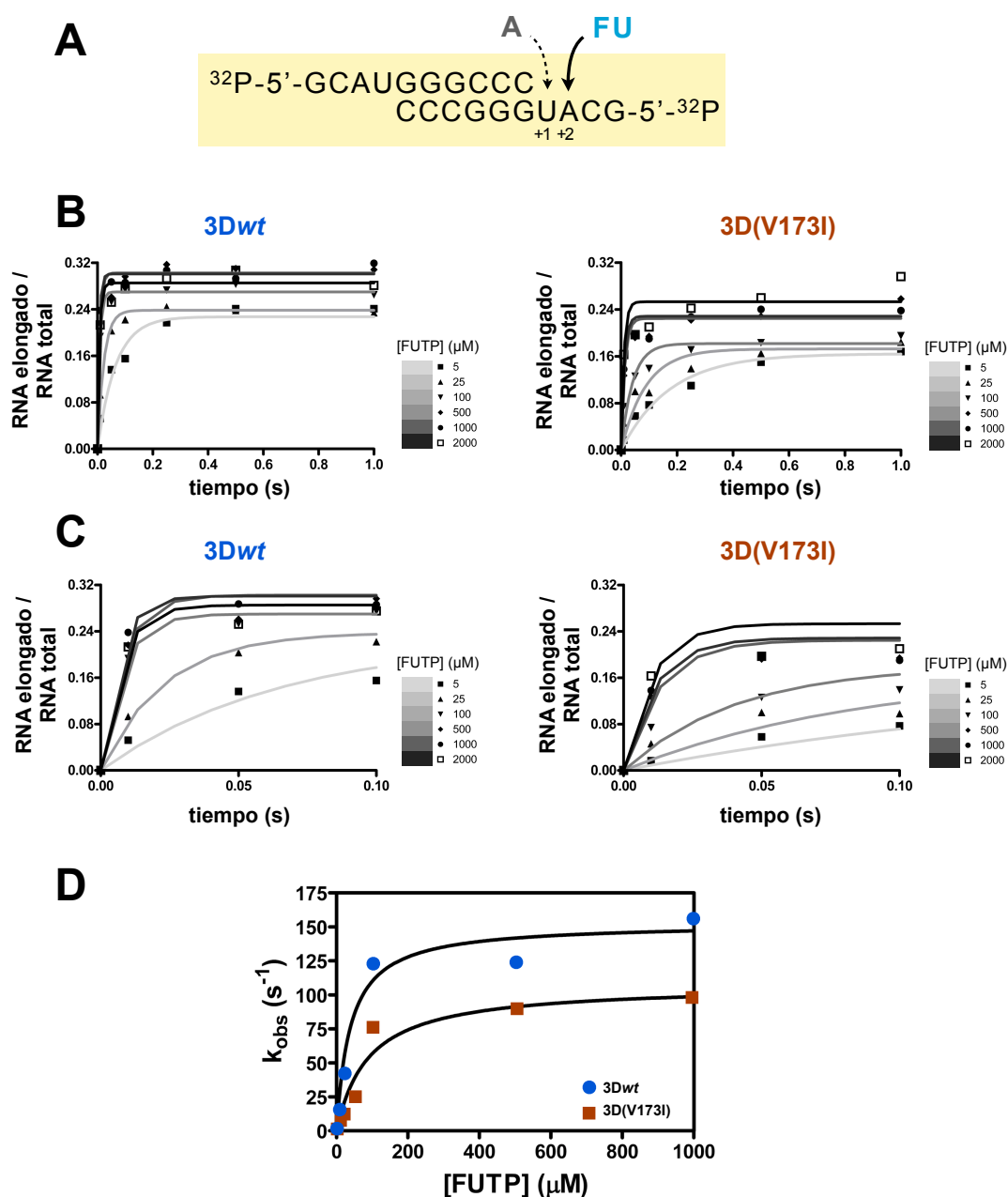


Figura 5.2.17 Cinética de incorporación de FUMP sobre sym/sub UA en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt y 3D(V173I). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. (B) Cinética de incorporación de FUMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 0,5 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub UA marcado e hibridado y 10 μM de ATP, para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de A en primera posición. El producto de la preincubación se mezcló con FUTP empleando el aparato de *quench-flow* y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Ampliación de las gráficas enseñadas en B al intervalo de incorporación de 0,0 a 0,1 segundos. (D) Representación de los valores de k_{obs} de 3Dwt (círculos azules) y 3D(V173I) (cuadrados burdeos) obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) y (C) a una curva exponencial, en función de la concentración de FUTP. Los puntos de cada curva se ajustaron a una hipérbola, de la que se obtienen los parámetros cinéticos resumidos en la Tabla 5.2.3.

La diferencia de selectividad para discernir entre FUTP y UTP no es inespecífica ya que las diferencias de selectividad entre las dos polimerasas en cuanto a incorporación de FUMP y CMP frente a G fueron menores que para la incorporación de UMP y FUMP frente a A (Figura 5.2.18; Tabla 5.2.3).

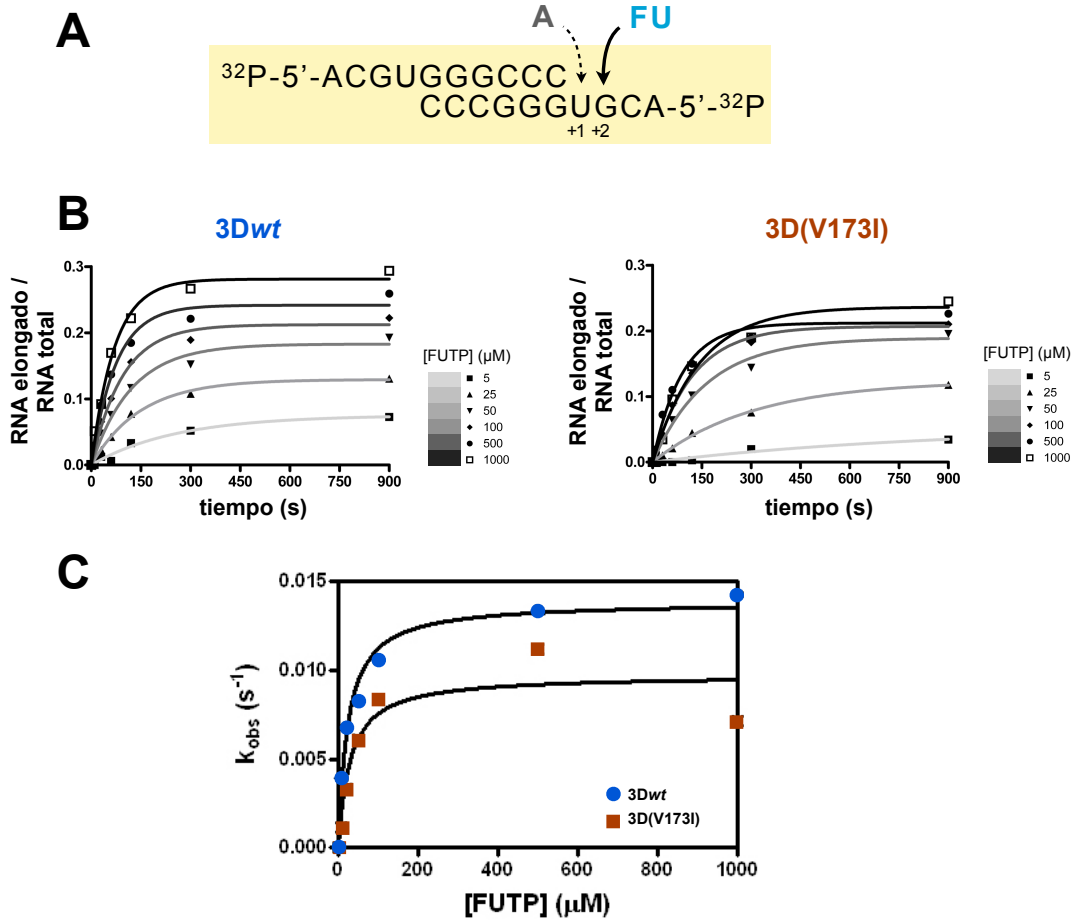


Figura 5.2.18 Cinética de incorporación de FUMP sobre sym/sub UG en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt y 3D(V173I). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. (B) Cinética de incorporación de FUMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 1 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub UG marcado e hibridado y 10 μM de ATP, para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de A en primera posición. Al producto de la preincubación se le añadió FUTP y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Representación de los valores de k_{obs} de 3Dwt (círculos azules) y 3D(V173I) (cuadrados burdeos) obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) a una curva exponencial, en función de la concentración de FUTP. Los puntos de cada curva se ajustaron a una hipérbola, de la que se obtienen los parámetros cinéticos resumidos en la Tabla 5.2.3.

5.2.12 Reconocimiento de fluorouracilo en el RNA molde

La polimerasa mutante incorporó UMP con una eficiencia mayor que el FUMP, a diferencia de la polimerasa *wt*. Para estudiar cómo las dos enzimas reconocían FU una vez el análogo está presente en el RNA, se realizaron ensayos de extensión de RNA con sym/sub Fu (Figura 4.2). De las cinéticas de incorporación de AMP frente a FU (Figura 5.2.19) se obtuvo un valor de $K_{d,app}$ para 3D(V173I) más bajo que para 3Dwt (Tabla 5.2.3), mostrando una afinidad de 3D(V173I) por el ATP diez veces mayor que 3Dwt. Cuando el mismo molde se empleó para medir incorporación de GMP (Figura 5.2.20) no se observaron grandes diferencias entre ambas polimerasas. Al comparar las cinéticas de incorporación de AMP y GMP se observó que 3D(V173I) disocia GTP del complejo de replicación de forma más efectiva que ATP (mayor $K_{d,GTP}$), mientras que con 3Dwt ocurre lo contrario (Tabla 5.2.3). Esto supone un aumento de 11 veces en la selectividad de la polimerasa del VFA a favor de incorporar A en lugar de G frente a FU, causado por la sustitución V173I. Los parámetros cinéticos sugieren que la sustitución V173I atenúa la actividad mutagénica de FU, al forzar el reconocimiento de nucleótidos que muestran apareamientos más canónicos. Además, esto encajaría con la limitación de transiciones A→G y U→C cuando el virus con la sustitución V173I en 3D replica en presencia de FU (apartado 5.2.4 de Resultados y 6.2.2 de Discusión).

5.2.13 Cinéticas de incorporación de nucleótidos incorrectos por 3Dwt y 3D(V173I)

El VFA con la sustitución V173I en la polimerasa mostró una frecuencia de mutación menor al ser pasado en cultivos celulares tanto en ausencia como en presencia de FU (Tabla 5.2.1), y los experimentos con clones biológicos tratados con GuH (Figura 5.2.10) sugieren que esta disminución modesta de complejidad podría tener impacto negativo en la adaptabilidad del virus. Era por tanto importante comprobar si la sustitución V173I provocaba en 3D un aumento de fidelidad de copia de la cual se derivaba la disminución de complejidad. Para ello se estudiaron las cinéticas de incorporación de nucleótidos incorrectos. La incorporación de GMP en segunda posición del sym/sub-AU por 3D(V173I) fue 3 veces menor que para 3Dwt (Figura 5.2.21). Sin embargo, al comparar la eficiencia catalítica de esta reacción con la eficiencia de incorporación de AMP en el mismo molde, no se observaron cambios

en la selectividad de 3D (Tabla 5.2.3). Al estudiar la incorporación de UMP frente a G empleando el sym/sub-UG (Fig. 5.2.22) también se detectó un aumento de eficiencia catalítica de 3D(V173I) (Tabla 5.2.3). Esta vez sí se observó un ligero incremento de selectividad en la polimerasa mutante.

Molde	NTP	3Dwt				3D(V173I)			
		$K_{d,app}^a$ (μM)	k_{pol}^b (s^{-1})	$k_{pol}/K_{d,app}^c$ ($\mu M^{-1} s^{-1}$)	Selectivity ^d	$K_{d,app}^a$ (μM)	k_{pol}^b (s^{-1})	$k_{pol}/K_{d,app}^c$ ($\mu M^{-1} s^{-1}$)	Selectivity
s/s-AU	A	45	250	5,6	$1,3 \times 10^5$	45	80	1,8	$1,2 \times 10^5$
	G	320	$1,4 \times 10^{-2}$	$4,4 \times 10^{-5}$		640	$1,0 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-5}$	
s/s-AC	G	12	250	20,8		13	165	12,7	
s/s-UA	U	56	220	3,9	0,9	37	275	7,4	6,2
	FU	36	150	4,2		90	108	1,2	
s/s-UG	C	15	300	20		15	300	20	
	FU	24	$1,4 \times 10^{-2}$	$5,8 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^4$	30	$1,0 \times 10^{-2}$	$3,3 \times 10^{-4}$	$6,1 \times 10^4$
	U	108	$8,7 \times 10^{-3}$	$8,1 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^5$	84	$3,9 \times 10^{-3}$	$4,6 \times 10^{-5}$	$4,3 \times 10^5$
s/s-Fu	A	390	180	0,46	$3,1 \times 10^2$	39	188	4,8	$33,9 \times 10^2$
	G	104	0,16	$1,5 \times 10^{-3}$		90	0,13	$1,4 \times 10^{-3}$	

Tabla 5.2.3 Parámetros cinéticos de incorporación de nucleótidos de las proteínas 3Dwt y 3D(V173I). Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos a partir de las Figuras 5.2.13 a 5.2.22. Los parámetros $K_{d,app}$ y k_{pol} se obtuvieron a partir del ajuste de las k_{obs} en función de la concentración de NTP a una ecuación hiperbólica ($k_{obs} = k_{pol} \times [NTP] / (K_{d,app} + [NTP])$), usando regresión no lineal. El significado de cada uno de los parámetros calculados es el siguiente:

^a $K_{d,app}$: Constante de disociación del NTP. El valor es inversamente proporcional a la afinidad de 3D por el sustrato.

^b k_{pol} : Tasa óptima de incorporación del NTP.

^c $k_{pol}/K_{d,app}$: Eficiencia catalítica de la 3D para incorporar un determinado NTP.

^d**Selectividad:** Viene determinada por la eficiencia de incorporación de un nucleótido correcto frente a la incorporación de un nucleótido incorrecto, empleando el mismo molde: $(k_{pol}/K_d)_{nucleótido\ correcto} / (k_{pol}/K_d)_{nucleótido\ incorrecto\ o\ análogo\ de\ nucleótido}$. Una mayor selectividad implica una replicación más fidedigna.

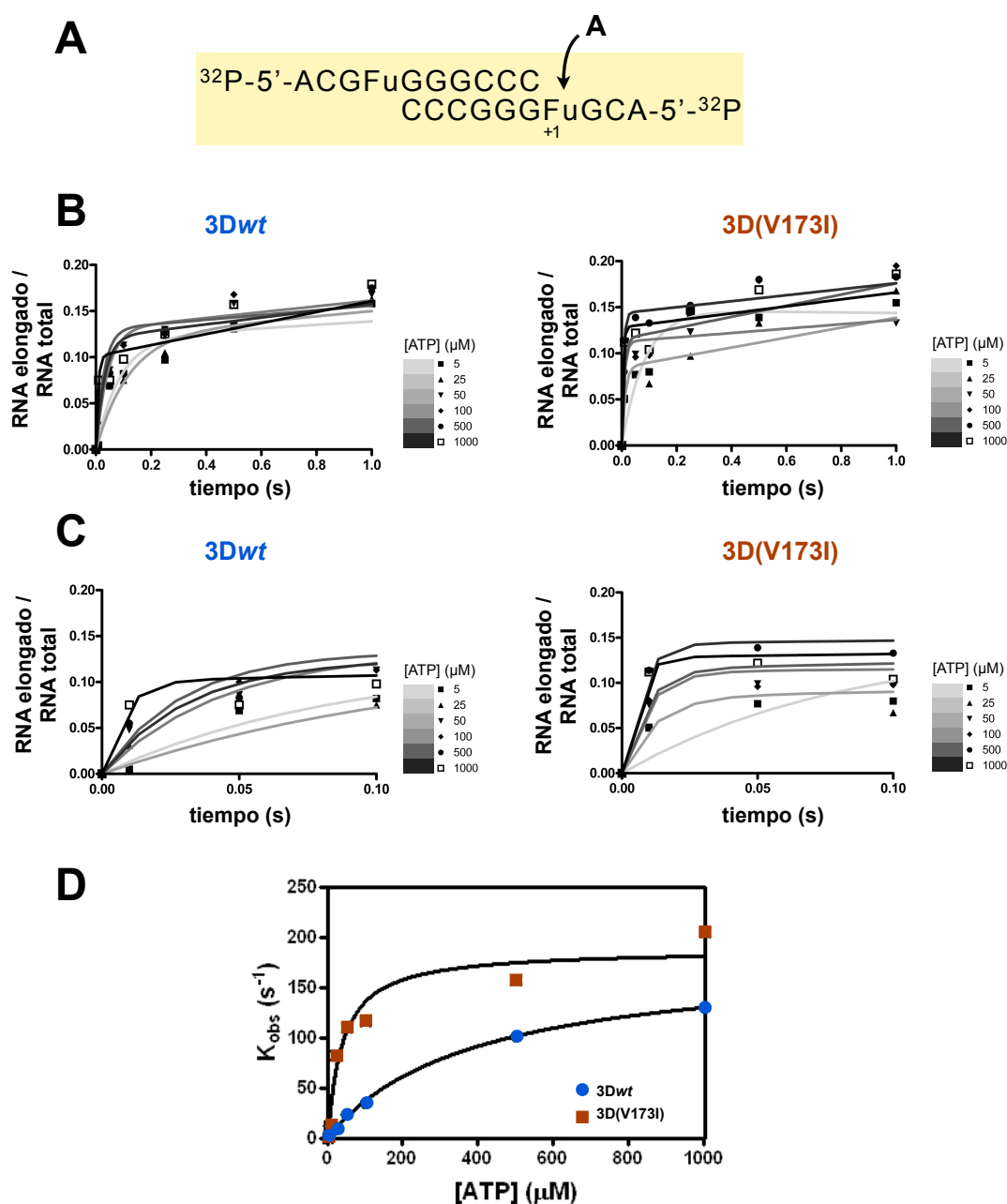


Figura 5.2.19 Cinética de incorporación de AMP sobre sym/sub FU en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt y 3D(V173I). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación del nucleótido que se incorpora. (B) Cinética de incorporación de AMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 0,5 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub FU marcado e hibridado para permitir la formación del complejo 3D-RNA. El producto de la preincubación se mezcló con FUTP empleando el aparato de *quench-flow* y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Ampliación de las gráficas enseñadas en B al intervalo de incorporación de 0,0 a 0,1 segundos. (D) Representación de los valores de k_{obs} de 3Dwt (círculos azules) y 3D(V173I) (cuadrados burdeos) obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) y (C) a una curva exponencial, en función de la concentración de ATP. Los puntos de cada curva se ajustaron a una hipérbola, de la que se obtienen los parámetros cinéticos resumidos en la Tabla 5.2.3.

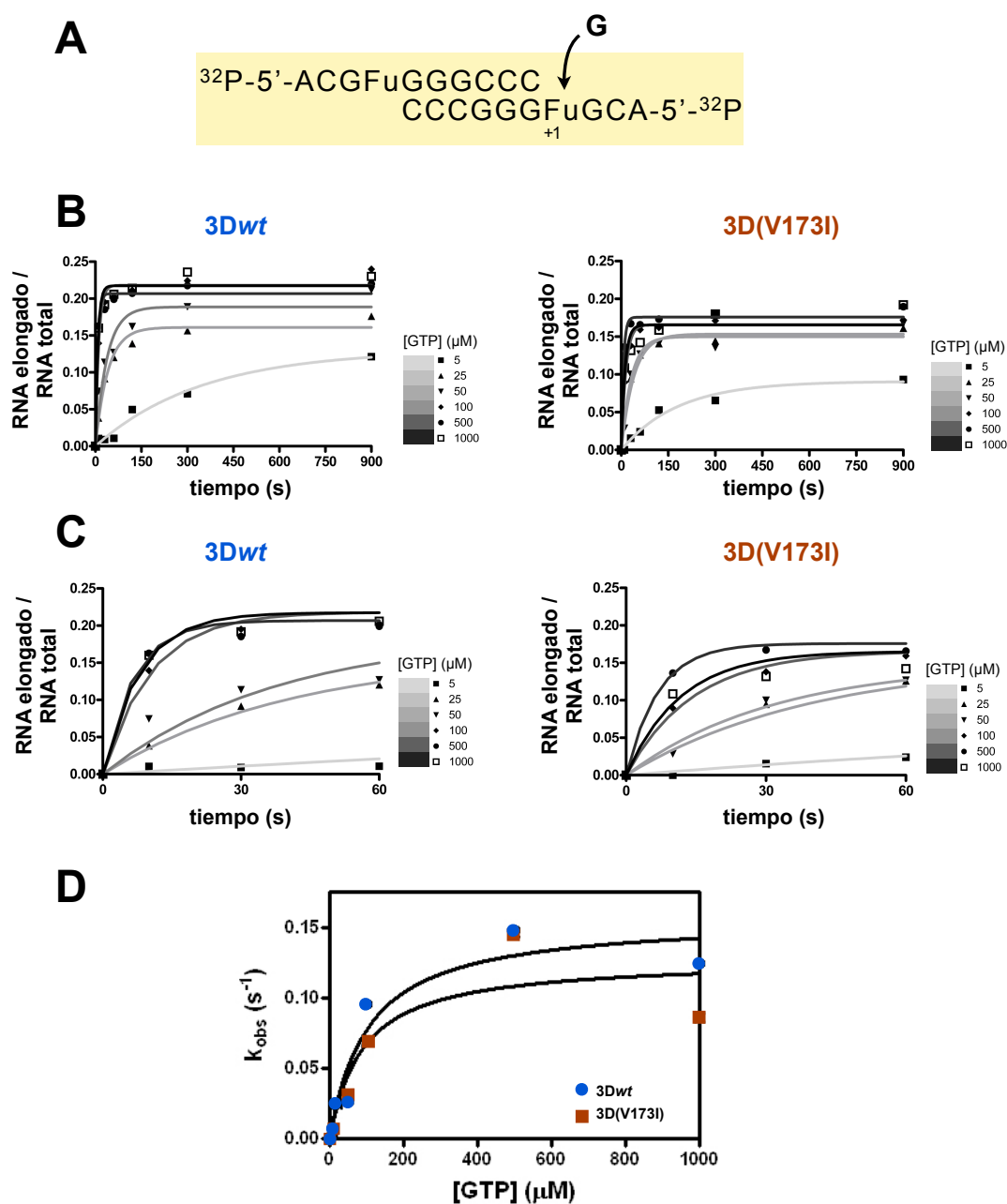


Figura 5.2.20 Cinética de incorporación de GMP sobre sym/sub FU en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt y 3D(V173I). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación del nucleótido que se incorpora. (B) Cinética de incorporación de GMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 1 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub FU marcado e hibridado para permitir la formación del complejo 3D-RNA. Al producto de la preincubación se le añadió FUTP y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Representación de los valores de k_{obs} de 3Dwt (círculos azules) y 3D(V173I) (cuadrados burdeos) obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) a una curva exponencial, en función de la concentración de GTP. Los puntos de cada curva se ajustaron a una hipérbola, de la que se obtienen los parámetros cinéticos resumidos en la Tabla 5.2.3.

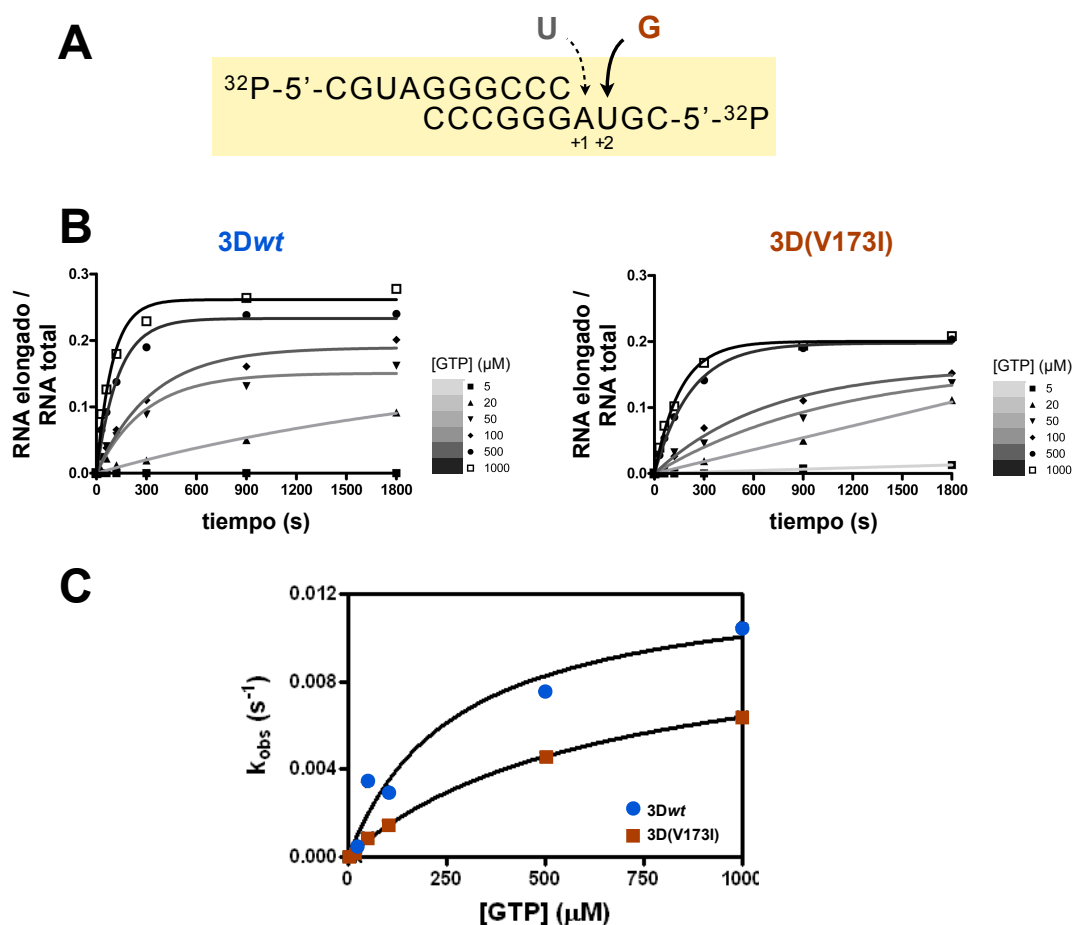


Figura 5.2.21 Cinética de incorporación de GMP sobre sym/sub AU en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt y 3D(V173I). **(A)** Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. **(B)** Cinética de incorporación de GMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 1 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub AU marcado e hibridado y 10 μM de UTP para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de U en primera posición. Al producto de la preincubación se le añadió GTP y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. **(C)** Representación de los valores de k_{obs} de 3Dwt (círculos azules) y 3D(V173I) (cuadrados burdeos) obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) a una curva exponencial, en función de la concentración de GTP. Los puntos de cada curva se ajustaron a una hipérbola, de la que se obtienen los parámetros cinéticos resumidos en la Tabla 5.2.3.

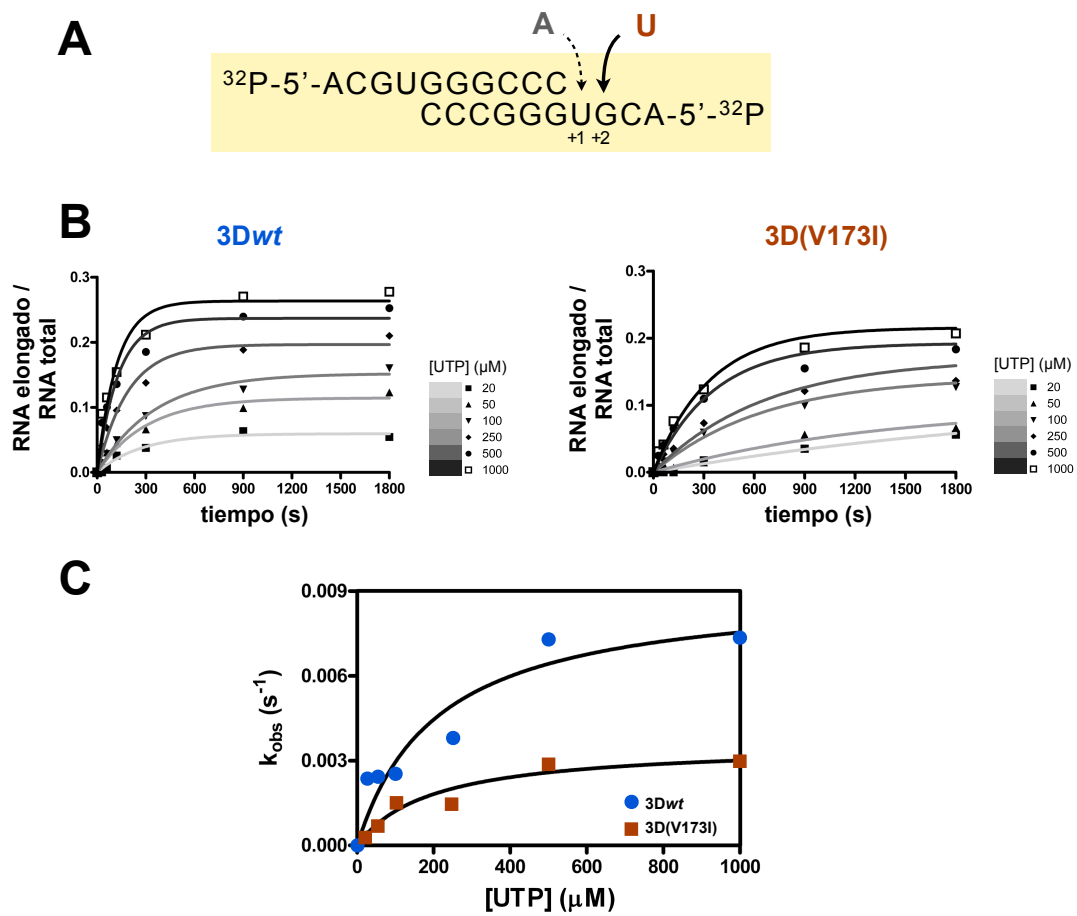


Figura 5.2.22 Cinética de incorporación de UMP sobre sym/sub UG en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt y 3D(V173I). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. (B) Cinética de incorporación de UMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 1 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub AU marcado e hibridado y 10 μM de ATP para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de A en primera posición. Al producto de la preincubación se le añadió UTP y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Representación de los valores de k_{obs} de 3Dwt (círculos azules) y 3D(V173I) (cuadrados burdeos) obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) a una curva exponencial, en función de la concentración de UTP. Los puntos de cada curva se ajustaron a una hipérbola, de la que se obtienen los parámetros cinéticos resumidos en la Tabla 5.2.3.

5.3 Caracterización bioquímica de variantes de 3D con sustituciones en una región del extremo amino-terminal

Al pasar el VFA en cultivos celulares en presencia de concentraciones crecientes de R, tres sustituciones en la proteína 3D se seleccionaron secuencialmente: M296I, P44S y P169S (al triple mutante se le denominó SSI) (Agudo *et al.*, 2010). La proteína 3D(SSI) mostró niveles de incorporación de R inferiores a la proteína silvestre en ensayos de extensión de moldes de RNA, aportando una ventaja adaptativa al virus tratado con el mutágeno (Introducción, apartado 2.6). Estructuralmente, la proteína 3D(SSI) mostró un cambio conformacional en el extremo N-terminal, concretamente en los residuos comprendidos entre el M16 y el K18 (Figura 5.3.1), que forman parte del subdominio *fingertips* de la polimerasa. Estos aminoácidos pertenecen a la secuencia MRKTKLAPT (del residuo 16 al 24 de la

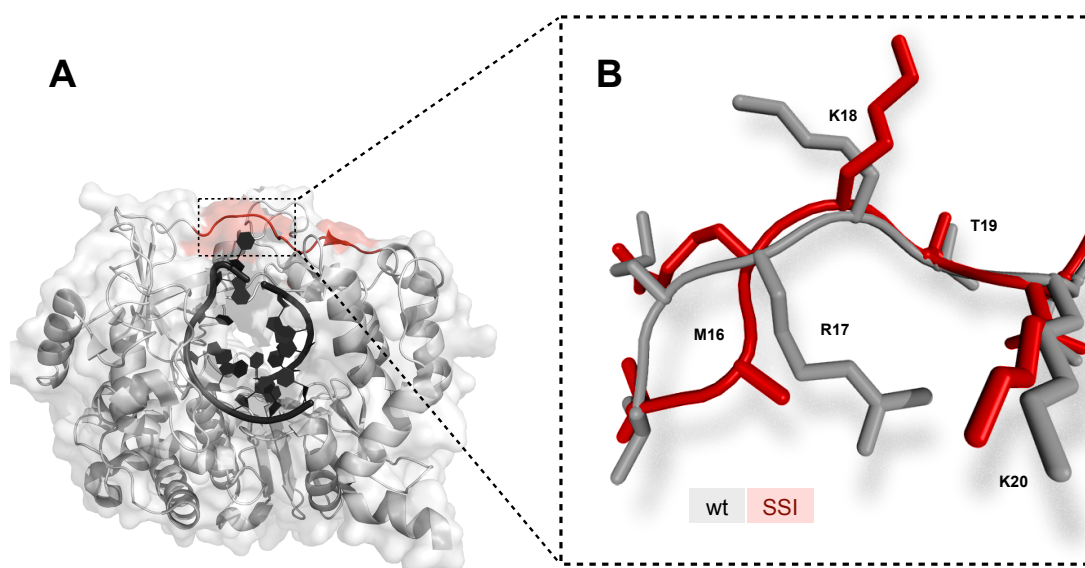


Figura 5.3.1 Cambio estructural en 3D(SSI). (A) Estructura tridimensional de 3Dwt (gris) en complejo con sym/sub UA (negro), donde se señala en rojo la región que comprende los residuos 16-24. PDB: 1WNE (B) Detalle de la región de la estructura que comprende los residuos 16-20. Se han fundido en una sola imagen las estructuras de 3Dwt (gris) y 3D(SSI) (rojo; PDB: 4IQX) para apreciar los cambios estructurales que acontecen en esta zona de la polimerasa. Esta figura se ha realizado con el programa "PyMOL Molecular Graphics System" (DeLano Scientific).

proteína 3D), la misma región estudiada en el laboratorio de Dr. Francisco Sobrino (CBMSO, CSIC-UAM) por su implicación en localización nuclear de 3D (Sánchez-Aparicio *et al.*, 2013). Se inició por tanto una colaboración entre el laboratorio del Dr.

Sobrino y el nuestro para estudiar conjuntamente las posibles implicaciones de esta región en síntesis de RNA y reconocimiento de nucleótidos. Se realizaron experimentos bioquímicos con las polimerasas que contienen los cambios K18E, K20E, K18A, K20A y K18A-K20A (o KAKA), en colaboración con D^a Flavia Caridi. Adicionalmente se ha expresado y purificado la proteína con la sustitución M16A por su hipotética implicación en fidelidad de copia, sugerida por su posición clave en la zona de entrada de nucleótidos.

5.3.1 Unión a RNA de 3D con sustituciones en la zona amino-terminal

Los residuos R17 y K20, que forman parte de la señal de localización nuclear (NLS) de 3D, son aminoácidos básicos que interaccionan directamente con el RNA (Ferrer-Orta *et al.*, 2004). Cambios de carga en esta región podrían afectar la interacción de esta proteína con el RNA y, por tanto, la actividad enzimática.

Para estudiar el grado de unión de la proteína 3D con RNA, se llevaron a cabo ensayos de retardo de RNA sym/sub en gel de poliacrilamida (apartado 4.22 de Materiales y Métodos). Se ensayaron las polimerasas con cambios de lisina a ácido glutámico (K18E y K20E) y las polimerasas con los cambios a alanina (K18A, K20A y KAKA, siendo éste el mutante con la doble sustitución K18A y K20A) y la polimerasa silvestre como control positivo. Los resultados muestran graves defectos de unión a RNA de las polimerasas 3D(K18E), 3D(K20E) y 3D(KAKA) (Figura 5.3.2). Se usó como control negativo la polimerasa 3D(DMD) con una triple sustitución que impide la unión a RNA (Arias *et al.*, 2005). Los retardos de RNA realizados con las polimerasas con cambios a alanina mostraron defectos menos drásticos de unión a RNA (Figura 5.3.2).

A pesar de que las proteínas con sustituciones en la NLS tienen problemas de unión a RNA, sabemos que estas polimerasas son capaces de sintetizar RNA en la célula. Infecciones de células BHK-21 con clones infecciosos construidos en el laboratorio del Dr. Sobrino mostraron la rápida reversión de las mutaciones K18E y K20A, indicativo de la inestabilidad de estas sustituciones, pero también de que estos virus fueron capaces de replicar. Los clones infecciosos con las sustituciones K18A y K20A produjeron virus viables y las mutaciones se mantuvieron en las poblaciones virales durante 5 pases seriados en cultivos celulares, siendo el mutante K18A el que

mostró más infectividad (resultados no publicados). No se obtuvo virus viable a partir del clon KAKA. Con el fin de estudiar cómo puede afectar la baja afinidad por el RNA a la incorporación de nucleótidos, se llevaron a cabo ensayos adicionales de formación de complejos 3D-RNA activos y de procesividad.

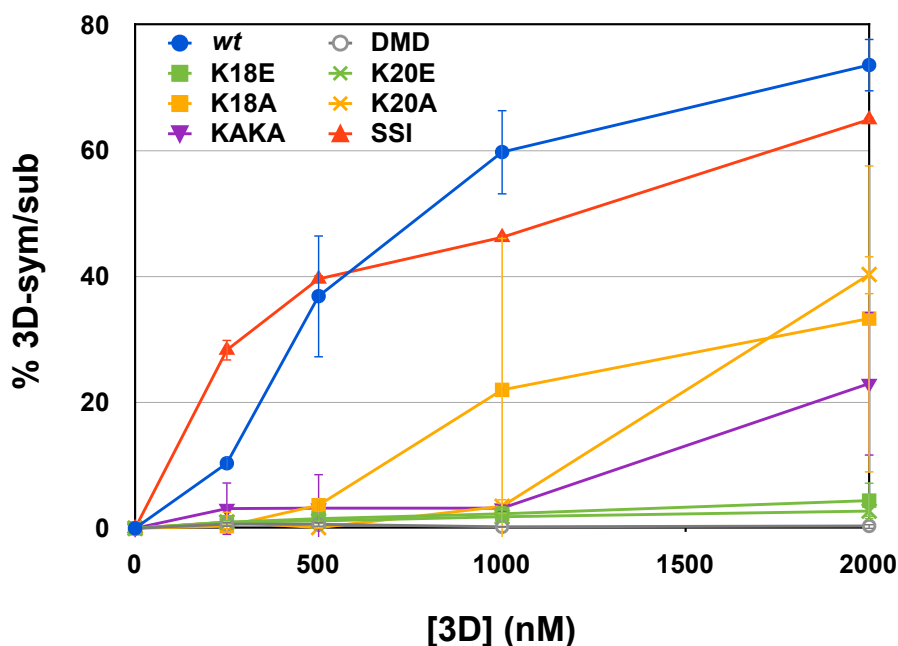


Figura 5.3.2 Análisis de la unión a RNA de 3Dwt, 3D(K18E), 3D(K20E), 3D(K18A), 3D(K20A) y 3D(KAKA) mediante retardo en gel. Representación del porcentaje de sym/sub AU marcado (20 nm) que fue retardado en función de la concentración de 3Dwt (círculos azules), 3D(K18E) (cuadrados verdes), 3D(K20E) (aspas verdes), 3D(K18A) (cuadrados naranjas), 3D(K20A) (aspas naranjas), 3D(KAKA) (triángulos púrpuras) y 3D(SSI) (triángulos rojos) en un gel de poliacrilamida al 4%. Se añadió una polimerasa adicional (3D(DMD) en gris), ya que muestra también defectos de unión a RNA (Arias *et al.*, 2005). Los ensayos se realizaron por triplicado y se muestran las desviaciones estándar.

El estudio de la formación de complejos 3D-RNA activos se llevó a cabo con el RNA sym/sub AU que fue incubado con las distintas polimerasas durante períodos de tiempo variables. La adición de ATP tras distintos tiempos de incubación (Figura 5.3.3.A) permitió medir la cantidad de RNA unida a 3D, a través de la cuantificación de la incorporación de AMP en el molde marcado. Los resultados (Figura 5.3.3.B) muestran cinéticas de formación de complejos de elongación más lentas para las polimerasas con cambios en el residuo 20 de la polimerasa, siendo la polimerasa con la sustitución K20E la más perjudicada.

Para estudiar cómo afectan las sustituciones en la NLS a la procesividad de 3D, se llevó a cabo un ensayo de extensión del molde M13 (Apartado 4.23.4 de

Materiales y Métodos). Se incubó cada una de las polimerasas con el molde M13 y se midió qué porcentaje del RNA elongado había sido extendido hasta el final. Los resultados (Figura 5.3.4) muestran nuevamente defectos en las polimerasas con sustituciones en la NLS, siendo más drásticos en las polimerasas con cambios a ácido glutámico y en el doble mutante 3D(KAKA).

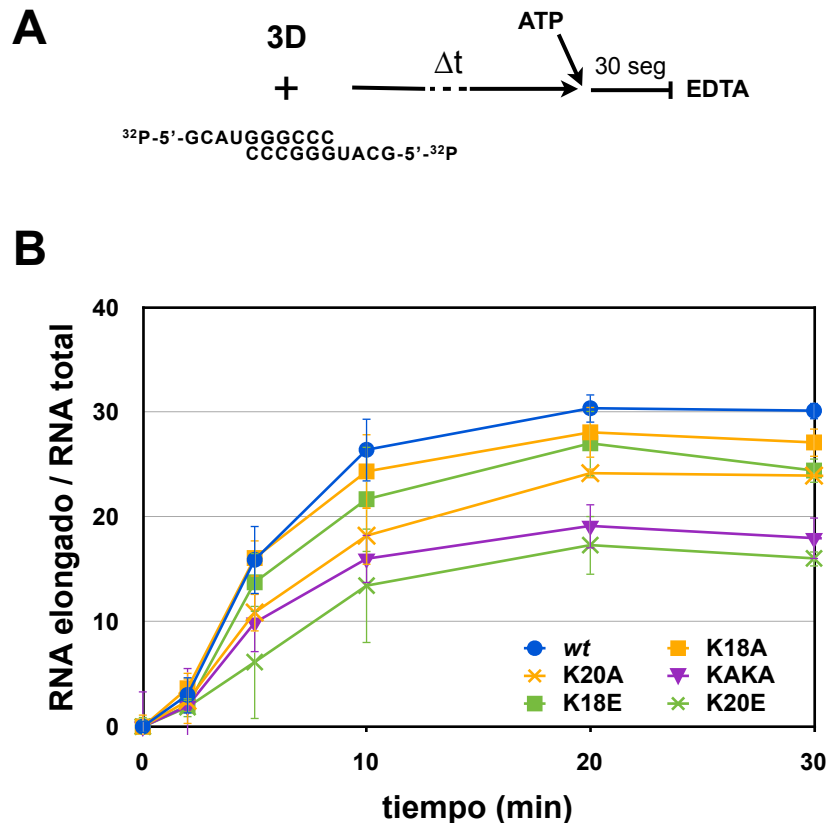


Figura 5.3.3 Cinéticas de formación del complejo de elongación de 3Dwt, 3D(K18E), 3D(K20E), 3D(K18A), 3D(K20A) y 3D(KAKA) con sym/sub UA. (A) Esquema del procedimiento que se siguió para estudiar la formación de complejos. Se preincubaron las distintas 3Ds con sym/sub UA y se midió la incorporación de AMP, añadido tras distintos tiempos de preincubación (Δt); la incorporación de ATP se midió tras 30 segundos de reacción (B) Porcentaje de sym/sub elongado en función del tiempo de preincubación de las polimerasas con el RNA. Los símbolos para la identificación de cada polimerasa se indican en la esquina inferior derecha de la gráfica.

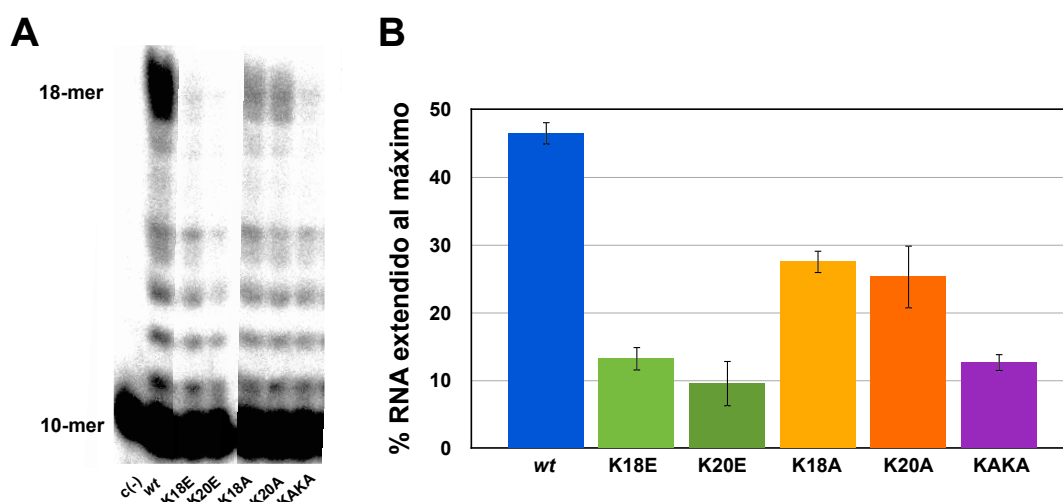


Figura 5.3.4 Procesividad de 3Dwt, 3D(K18E), 3D(K20E), 3D(K18A), 3D(K20A) y 3D(KAKA) con el molde M13. (A) Análisis electroforético de los productos que resultan de la elongación de M13 (Figura 4.2) al añadir ATP, UTP y CTP. **(B)** Porcentaje de RNA elongado completamente respecto al RNA total de longitud superior a 10-mer a partir de análisis densitométricos. El grado de significación estadística de los datos es alto para todas las polimerasas mutantes (ANOVA de un factor: $p < 0,001$).

5.3.2 Actividad enzimática de 3D con sustituciones en la zona amino-terminal

Se evaluó el efecto de las sustituciones en la zona N-terminal de 3D en la incorporación de nucleótidos empleando moldes homopoliméricos y heteropoliméricos. En primer lugar se realizó un experimento estándar de determinación de actividad enzimática mediante elongación de un molde de poli(A)/oligo(dT₁₅) (apartado 4.20.1 de Materiales y Métodos). Nuevamente, las polimerasas con cambios a glutámico en posición 18 ó 20 mostraron una actividad mucho menor que 3Dwt (Figura 5.3.5). Las polimerasas con cambios a alanina mostraron una menor caída en actividad que las polimerasas con sus respectivos cambios a glutámico, aunque el doble mutante KAKA fue el más afectado, sugiriendo un efecto negativo conjunto de ambos cambios.

El ensayo de actividad descrito en el párrafo anterior cuenta con variables que dependen de la unión a RNA, tales como la formación del complejo replicativo y la procesividad. Estos factores son desfavorables para las polimerasas alteradas, por lo que se llevaron a cabo estudios de incorporación de un solo nucleótido en condiciones de estado pre-estacionario. Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Dr. S. G. Sarafianos empleando el método del *rapid quench-flow* (apartado 4.23.2 de

Materiales y Métodos). Se midió la incorporación de AMP y GMP en la segunda posición de sym/sub AU y sym/sub AC (Materiales y Métodos, Figura 4.2), respectivamente, tras preincubar durante un mínimo de 15 minutos con UTP, tiempo suficiente para la formación del complejo 3D-RNA con todas las polimerasas y para la incorporación de U en primera posición. Las constantes de velocidad (k_{obs}) fueron determinadas bajo condiciones de *single turnover* (sin cambio de molde) y se midió la cantidad de producto formado a lo largo del tiempo con distintas concentraciones de NTP. La representación de la k_{obs} frente a la concentración de NTP se ajustó a una hipérbola para obtener los parámetros cinéticos (k_{pol} , K_d) de las distintas polimerasas. Los resultados (que se muestran en las figuras 5.3.6, 5.3.7, 5.3.8, 5.3.9, 5.3.10 y se resumen en la Tabla 5.3.1) indican que todas las polimerasas estudiadas mantienen su capacidad de incorporar nucleótidos, pero que la eficiencia catalítica de este proceso se ve afectada en las polimerasas con cambios en la NLS. Los datos sugieren que esta pérdida de eficiencia catalítica se debe generalmente a descensos en la tasa de incorporación de nucleótidos (k_{pol}), a excepción de aquellos casos, como la incorporación de A frente a sym/sub AU por 3D(K20A), en los que incrementos muy grandes en constante de disociación con el sustrato ($K_{d,app}$) son los que reducen drásticamente la eficiencia de la reacción.

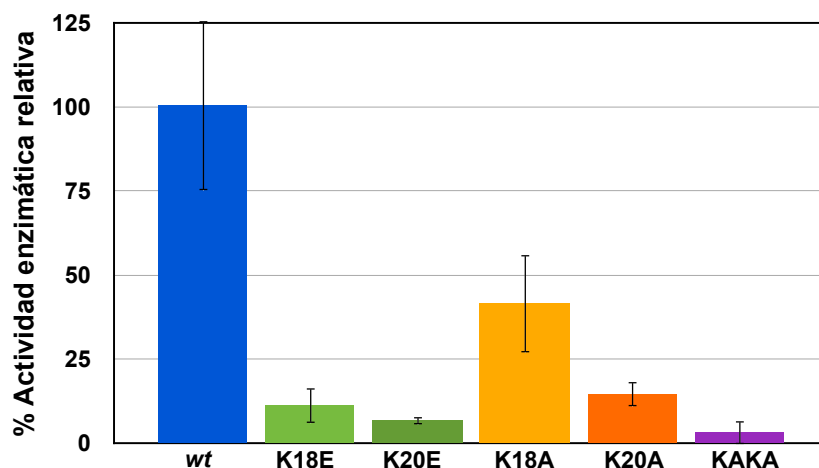


Figura 5.3.5 Ensayo de actividad de 3Dwt, 3D(K18E), 3D(K20E), 3D(K18A), 3D(K20A) y 3D(KAKA). Se muestra la actividad específica relativa a 3Dwt (azul) ($6,15 \pm 1,5$ pmol UMP incorporado/min x μ g de enzima), determinada en ensayos de polimerización, empleando como molde poli(A)/oligo(dT). Se mide la cantidad de [α - 32 P]UTP que ha sido empleada para la síntesis de RNA. El grado de significación estadística de los datos es alto para todas las polimerasas mutantes (ANOVA de un factor: $p < 0,001$).

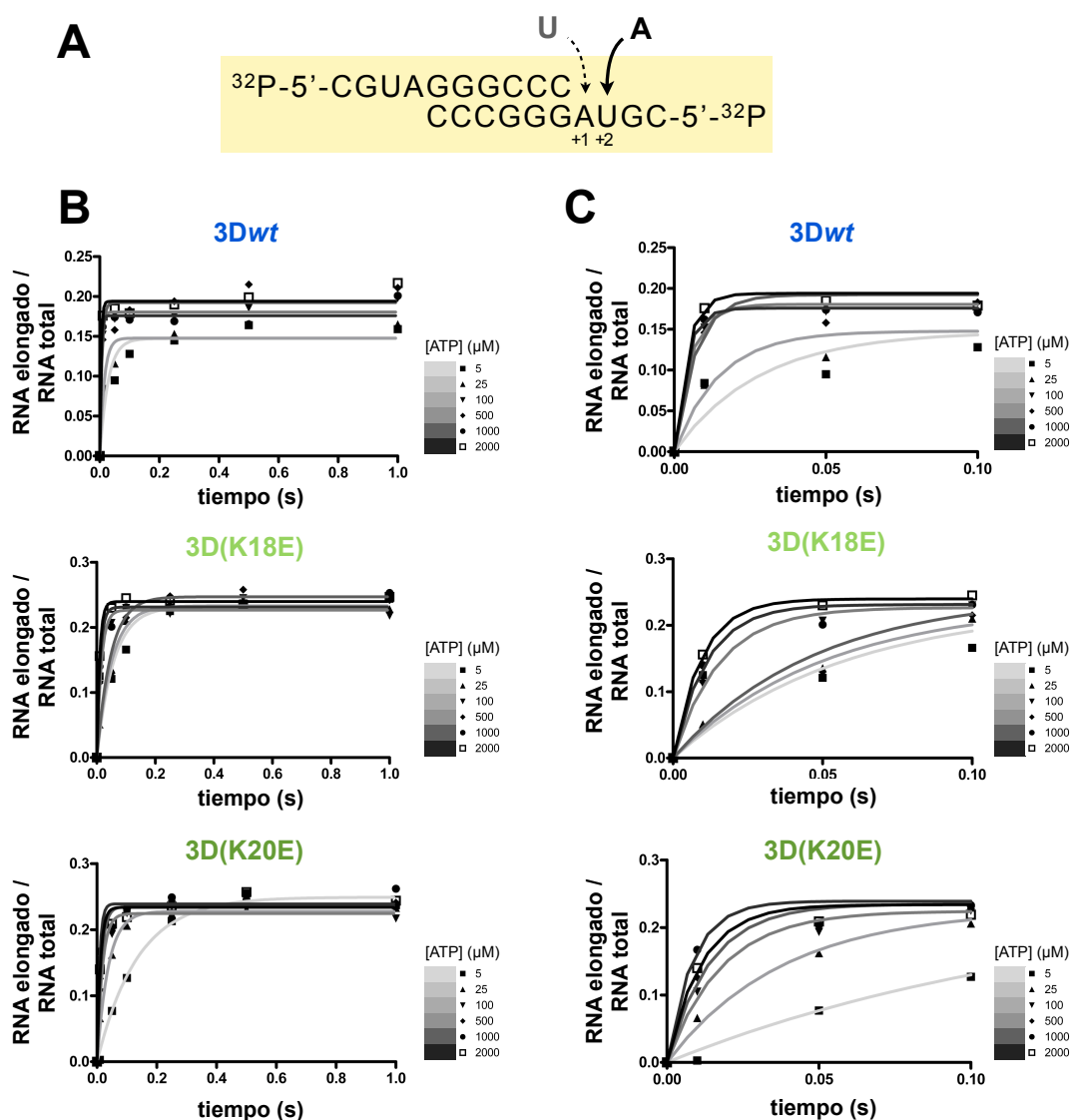


Figura 5.3.6 Cinética de incorporación de AMP sobre sym/sub AU en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt, 3D(K18E) y 3D(K20E). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. (B) Cinética de incorporación de AMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 0,5 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub AU marcado e hibridado y 10 μM de UTP, para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de U en primera posición. El producto de la preincubación se mezcló con ATP empleando el aparato de *quench-flow* y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Ampliación de las gráficas enseñadas en B al intervalo de incorporación de 0,0 a 0,1 segundos. La representación de los valores de k_{obs} obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) a una curva exponencial en función de la concentración de sustrato se encuentra en la Figura 5.3.10.

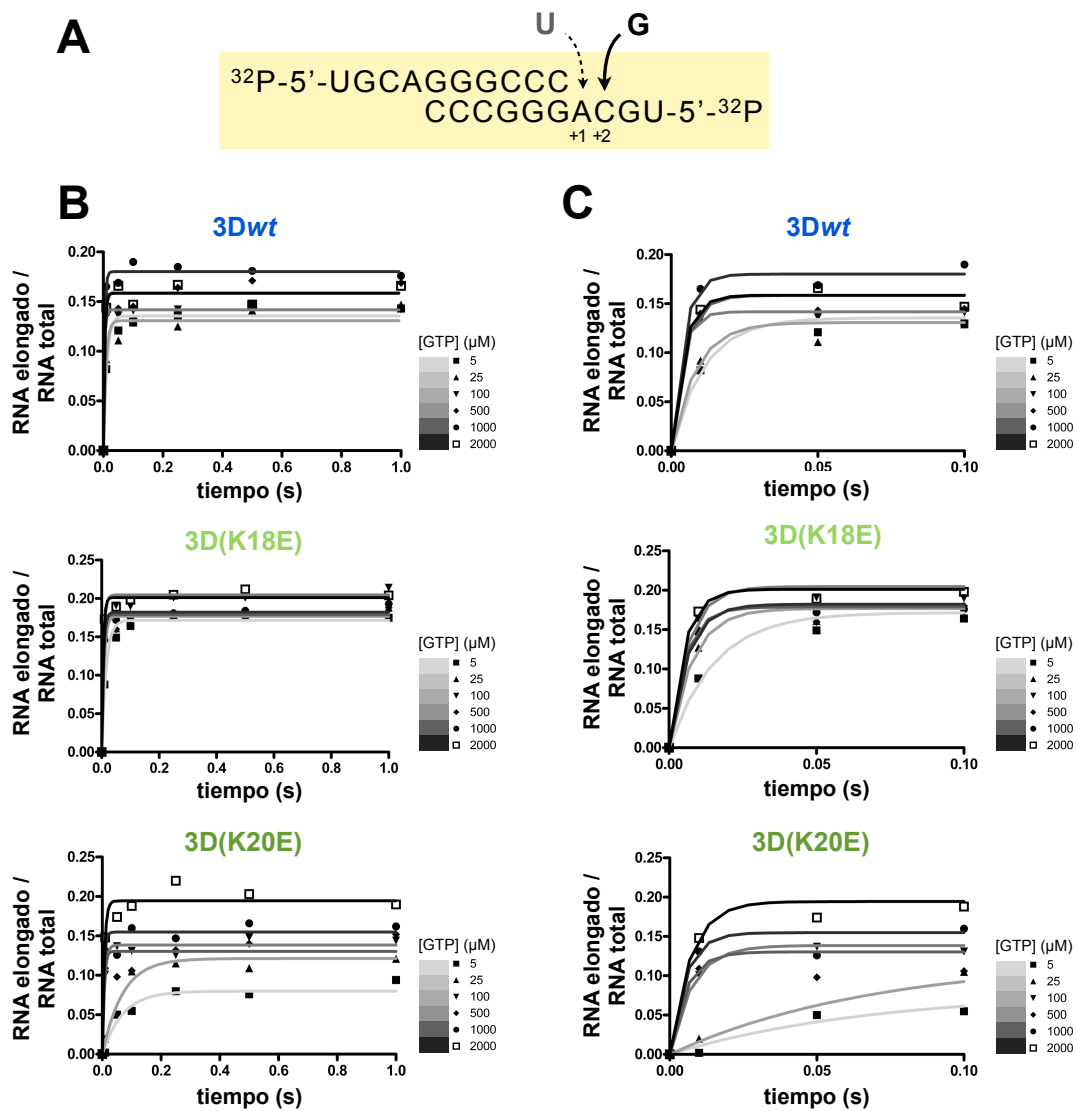


Figura 5.3.7 Cinética de incorporación de GMP sobre sym/sub AC en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt, 3D(K18E) y 3D(K20E). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. (B) Cinética de incorporación de GMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 0,5 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub AC marcado e hibridado y 10 μM de UTP, para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de U en primera posición. El producto de la preincubación se mezcló con GTP empleando el aparato de *quench-flow* y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Ampliación de las gráficas enseñadas en B al intervalo de incorporación de 0,0 a 0,1 segundos. La representación de los valores de k_{obs} obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) a una curva exponencial en función de la concentración de sustrato se encuentra en la Figura 5.3.10.

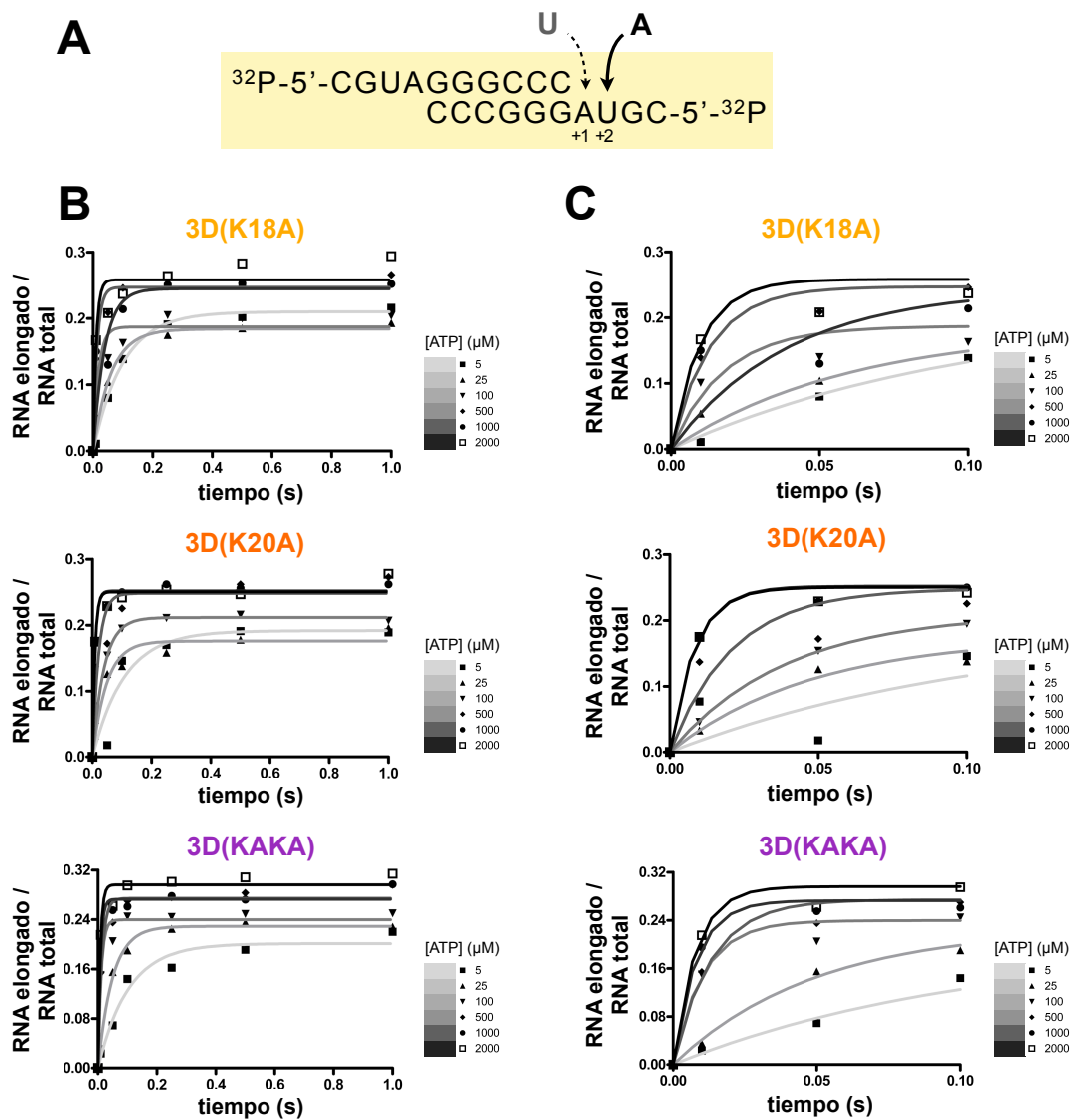


Figura 5.3.8 Cinética de incorporación de AMP sobre sym/sub AU en condiciones de estado pre-estacionario con 3D(K18A), 3D(K20A) y 3D(KAKA). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. (B) Cinética de incorporación de AMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 0,5 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub AU marcado e hibridado y 10 μM de UTP, para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de U en primera posición. El producto de la preincubación se mezcló con ATP empleando el aparato de *quench-flow* y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Ampliación de las gráficas enseñadas en B al intervalo de incorporación de 0,0 a 0,1 segundos. La representación de los valores de k_{obs} obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) a una curva exponencial en función de la concentración de sustrato se encuentra en la Figura 5.3.10.

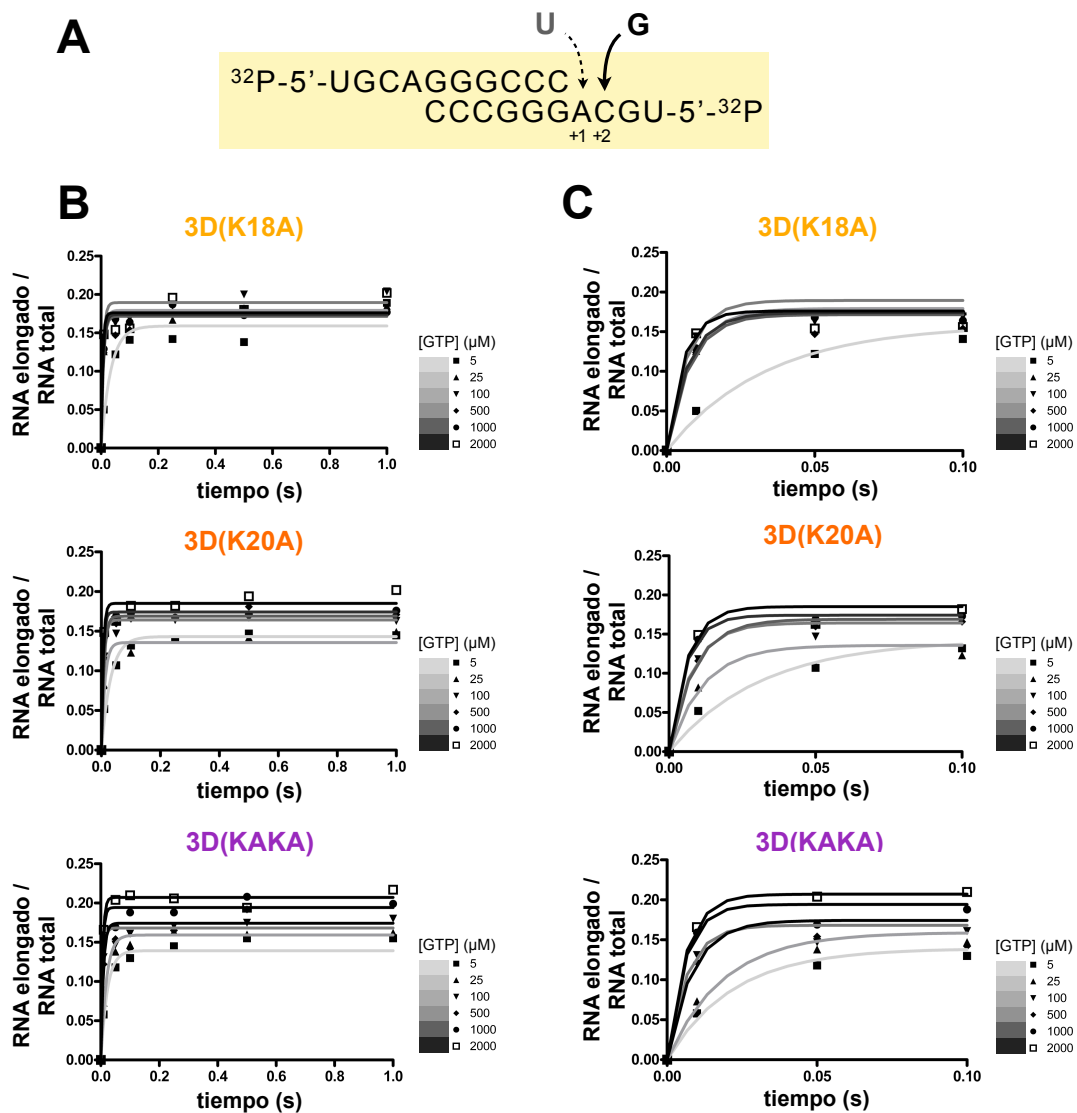


Figura 5.3.9 Cinética de incorporación de GMP sobre sym/sub AC en condiciones de estado pre-estacionario con 3D(K18A), 3D(K20A) y 3D(KAKA). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. (B) Cinética de incorporación de GMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 0,5 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub AC marcado e hibridado y 10 μM de UTP, para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de U en primera posición. El producto de la preincubación se mezcló con GTP empleando el aparato de *quench-flow* y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Ampliación de las gráficas enseñadas en B al intervalo de incorporación de 0,0 a 0,1 segundos. La representación de los valores de k_{obs} obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) a una curva exponencial en función de la concentración de sustrato se encuentra en la Figura 5.3.10.

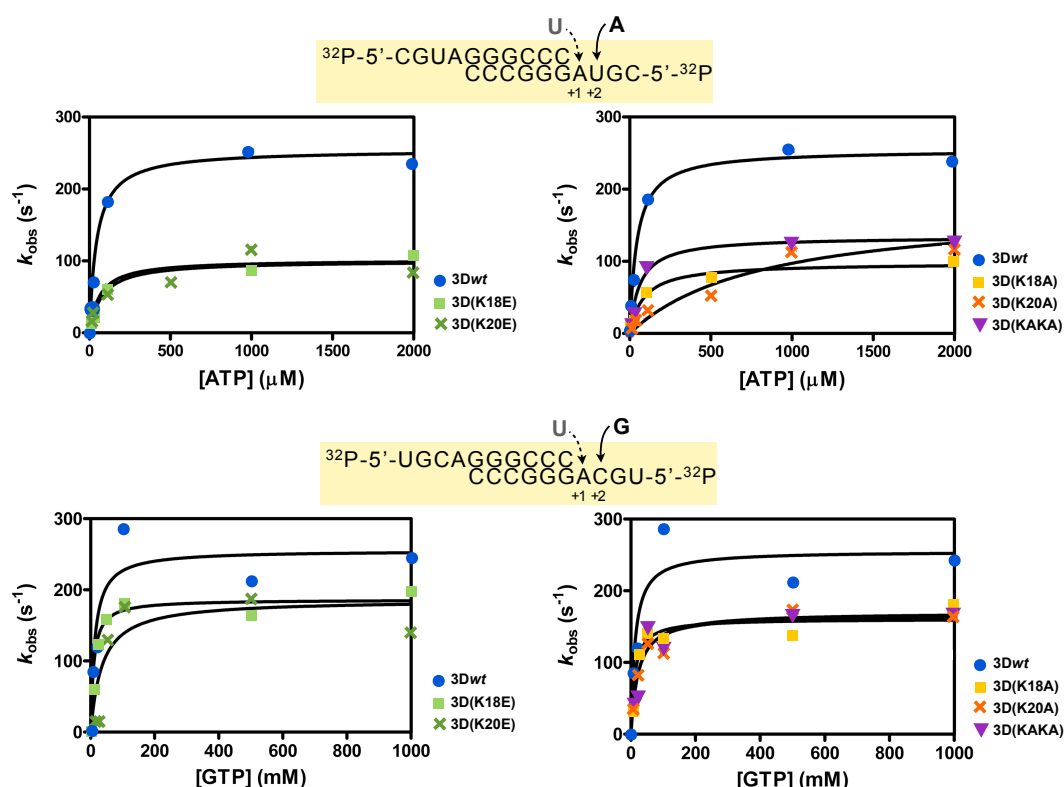


Figura 5.3.10 Cálculo de parámetros cinéticos para los nucleótidos correctos en el estado pre-estacionario. Representación de los valores de k_{obs} obtenidos al ajustar las cinéticas de incorporación representadas en las Figuras 5.3.6-9 a una curva exponencial, en función de la concentración de sustrato.

	A sobre sym/sub AU			G sobre sym/sub AC		
	$K_{d,app}^a$ (μM)	k_{pol}^b (s ⁻¹)	$k_{pol}/K_{d,app}^c$ (μM ⁻¹ s ⁻¹)	$K_{d,app}^a$ (μM)	k_{pol}^b (s ⁻¹)	$k_{pol}/K_{d,app}^c$ (μM ⁻¹ s ⁻¹)
3Dwt	45	250	5.6	12	250	20.8
3D(K18E)	60	100	1.7	9	185	20.5
3D(K20E)	75	100	1.3	35	185	5.3
3D(K18A)	85	100	1.2	11	160	14.5
3D(K20A)	800	180	0.2	21	167	8.0
3D(KAKA)	430	160	1.4	23	170	7.4

Tabla 5.3.1 Parámetros cinéticos de incorporación de nucleótidos de las proteínas 3Dwt, 3D(K18E), 3D(K20E), 3D(K18A), 3D(K20A) y 3D(KAKA). Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos a partir de los datos de la Figura 5.3.10. Los parámetros $K_{d,app}$ y k_{pol} se calcularon a partir del ajuste de las k_{obs} en función de la concentración de NTP a una ecuación hiperbólica ($k_{obs} = k_{pol} \times [NTP] / (K_{d,app} + [NTP])$), usando regresión no lineal. El significado de cada uno de los parámetros calculados es el siguiente:

^a $K_{d,app}$: Constante de disociación del NTP. El valor es inversamente proporcional a la afinidad de 3D por el sustrato.

^b k_{pol} : Tasa óptima de incorporación del NTP.

^c $k_{pol}/K_{d,app}$: Eficiencia catalítica de la 3D para incorporar un determinado NTP.

Dado que la replicación del RNA del VFA se inicia mediante la uridilación de VPg, se estudió la repercusión de las distintas sustituciones en el extremo N-terminal de 3D en esta actividad clave. La reacción en presencia de Mg^{++} , 3CD y RNA cre no permitió medir uridilación con las polimerasas con cambios a ácido glutámico, indicio de un defecto en uridilación de VPg (Figura 5.3.11.A). Se prosiguió con el ensayo de uridilación de VPg en presencia de Mn^{++} y poli(A) para la obtención de datos que permitiesen comparar las actividades de las distintas polimerasas. El resultado de este ensayo mostró una disminución en la actividad de las polimerasas con el extremo N-terminal alterado, siendo más acusada en las polimerasas con cambios a ácido glutámico y en 3D(KAKA) (Figura 5.3.11).

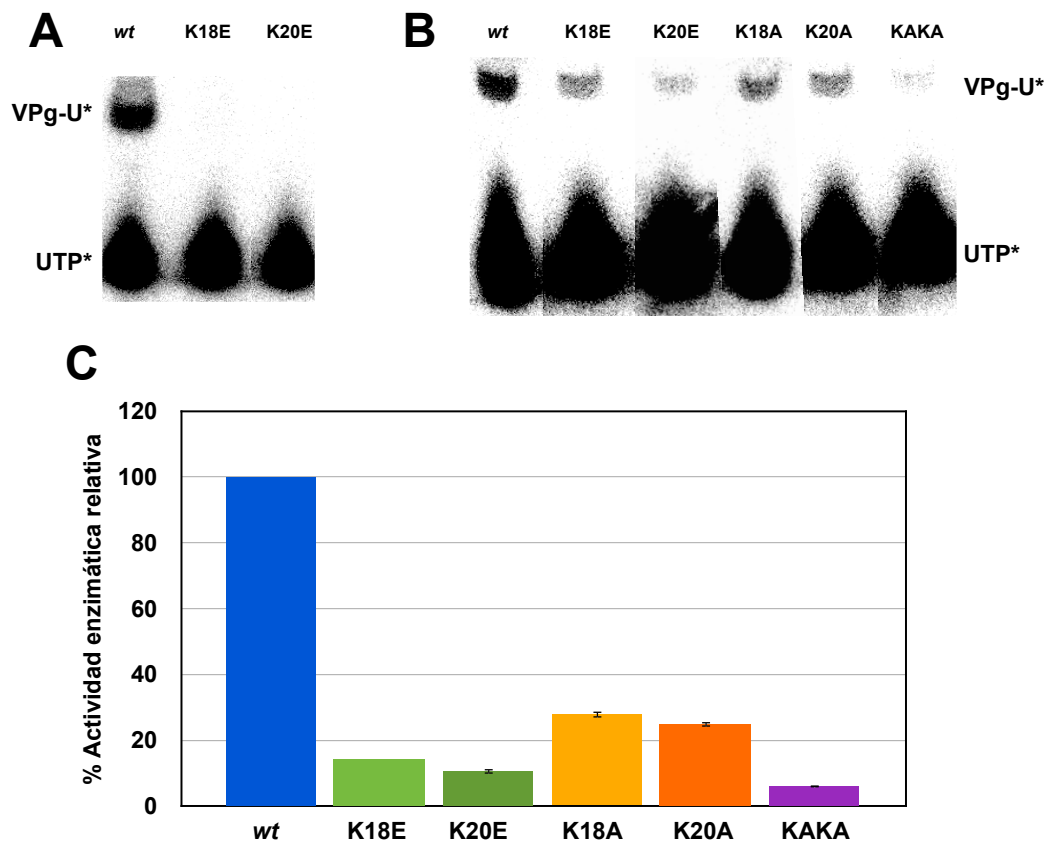


Figura 5.3.11 Uridilación de VPg por las distintas polimerasas purificadas. (A) Gel de poliacrilamida con los productos de una reacción de uridilación de VPg en presencia de Mg^{++} , cre y 3CD con 3Dwt, 3D(K18E) y 3D(K20E). (B) Gel de poliacrilamida con los productos de una reacción de uridilación de VPg en presencia de Mn^{++} y poli(A) con las polimerasas indicadas. (C) Se muestra la actividad de uridilación relativa a 3Dwt ($3,8 \times 10^{-2}$ pmol de UMP incorporado/min \times μ g de enzima) del ensayo realizado en presencia de Mn^{++} y poli(A). El grado de significación estadística de los datos es alto para todas las polimerasas mutantes (ANOVA de un factor: $p < 0,001$).

5.3.3 Reconocimiento de nucleótidos por 3D con sustituciones en la zona amino-terminal

Dado que 3D(SSI), que presenta alteraciones estructurales en la NLS de la polimerasa (Agudo *et al.*, 2010), incorpora R con menor eficiencia que 3Dwt, era de interés saber si cambios de aminoácido en esta región estarían igualmente afectando a la incorporación de R. Se comparó la incorporación de AMP, GMP y RMP por 3Dwt, 3D(K18E), 3D(K20E) y 3D(SSI) empleando sym/sub AU y sym/sub CA como molde/cebadores. Sorprendentemente, las polimerasas con K18E y K20E incorporaron más RMP que 3Dwt ($p < 0,001$; ANOVA de dos factores), mientras que la incorporación de AMP fue similar (Figura 5.3.12). 3D(SSI) incorporó menos RMP que 3Dwt, tal como ha sido descrito anteriormente (Agudo *et al.*, 2010) y de acuerdo con el fenotipo de resistencia a R del VFA portador de las tres sustituciones. La mayor incorporación de RMP por 3D(K18E) y 3D(K20E) que por 3Dwt también se observó con el molde sym/sub CA ($p < 0,001$; ANOVA de dos factores) (Figura 5.3.13). Esta diferente repercusión de la presencia de E en posición 18 ó 20 en cuanto a la incorporación de RMP frente a nucleótidos estándar es un punto interesante cuya clarificación requerirá estudios adicionales.

Cuando se estudió la incorporación de R por las polimerasas con cambios a alanina, los resultados indicaron una incorporación de RMP frente a U mayor que la de 3Dwt (Figura 5.3.14), pero el incremento fue menos notable que con los mutantes a ácido glutámico ($p < 0,001$ para K20A y KAKA y $p = 0,04$ para K18A; ANOVA de dos factores). Al ensayar la incorporación de RMP frente a C se observó que 3D(K18A) incorporaba más RMP que el resto de polimerasas, no apreciando diferencias entre 3D(K20A), 3D(KAKA) y 3Dwt (Figura 5.3.15) ($p < 0,001$ para 3D(K18A) y $p = 1$ para 3Dwt, 3D(K18E) y 3D(KAKA); ANOVA de dos factores). De nuevo, las polimerasas con cambios a alanina muestran un comportamiento parecido a las enzimas con cambios a ácido glutámico, pero menos acentuado.

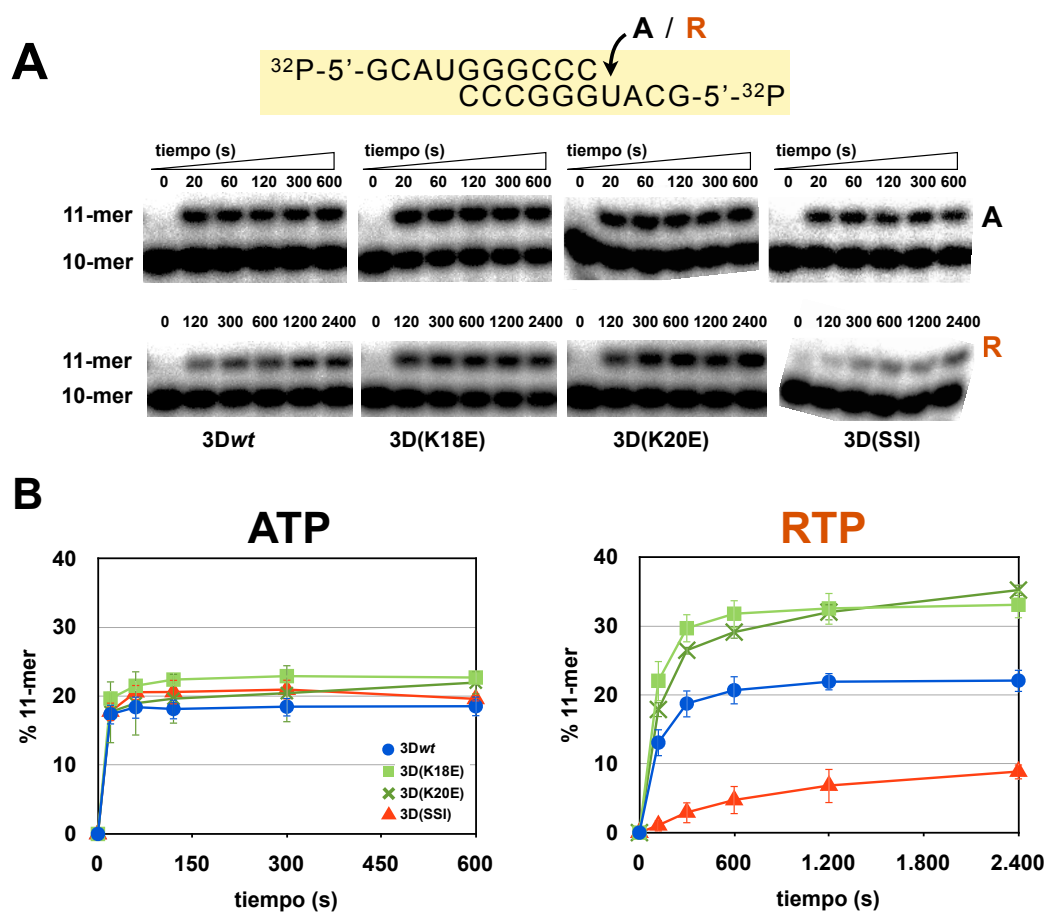


Figura 5.3.12 Incorporación de AMP y RMP en el molde/cebador sym/sub UA por 3Dwt, 3D(K18E), 3D(K20E) y 3D(SSI). (A) Análisis electroforético de los productos que resultan de la incorporación de AMP (A) o RMP (R) en el sym/sub UA (en caja amarilla) por las polimerasas indicadas. 10-mer hace referencia al RNA de 10 nucleótidos (sym/sub original) y 11-mer es el RNA producido al ser elongado por la polimerasa (B) Porcentaje de sym/sub elongado en función del tiempo de reacción de 3Dwt (círculos azules), 3D(K18E) (cuadrados verdes), 3D(K20E) (aspas verdes) y 3D(SSI) (triángulos rojos), basado en las medidas densitométricas de las bandas mostradas en (A). En la izquierda se muestra la incorporación de AMP y a la derecha la incorporación de RMP.

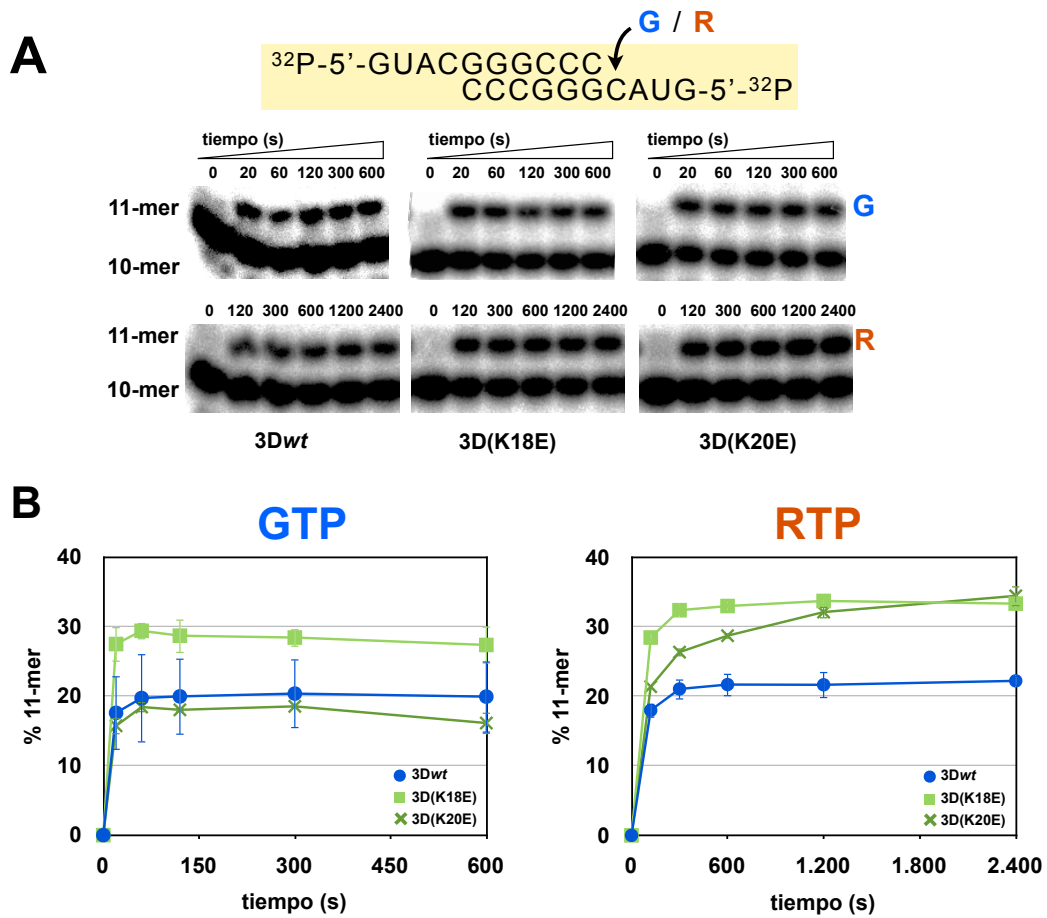


Figura 5.3.13 Incorporación de GMP y RMP en el molde/cebador sym/sub CA por 3Dwt, 3D(K18E) y 3D(K20E). (A) Análisis electroforético de los productos que resultan de la incorporación de GMP (G) o RMP (R) en el sym/sub CA (en caja amarilla) por las polimerasas indicadas. 10-mer hace referencia al RNA de 10 nucleótidos (sym/sub original) y 11-mer es el RNA producido al ser elongado por la polimerasa (B) Porcentaje de sym/sub elongado en función del tiempo de reacción de 3Dwt (círculos azules), 3D(K18E) (cuadrados verdes) y 3D(K20E) (aspas verdes), basado en las medidas densitométricas de las bandas mostradas en (A). En la izquierda se muestra la incorporación de GMP y a la derecha la incorporación de RMP.

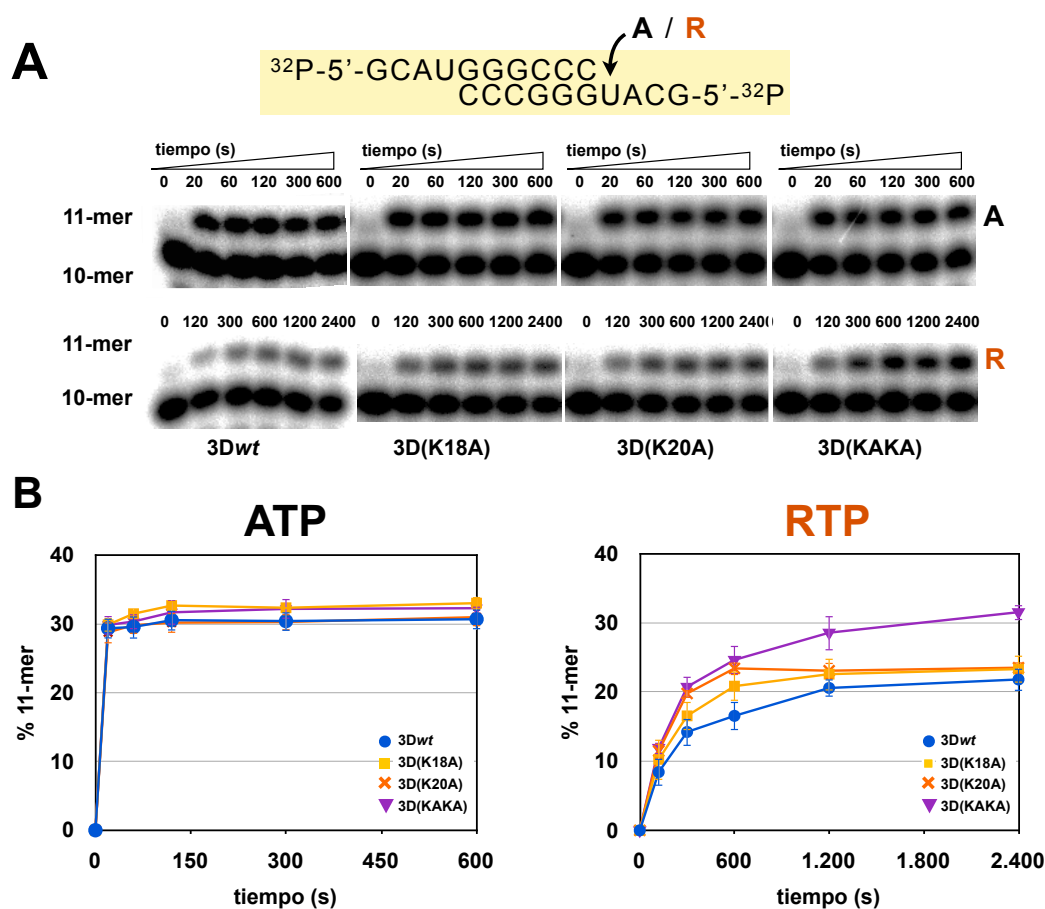


Figura 5.3.14 Incorporación de AMP y RMP en el molde/cebador sym/sub UA por 3Dwt, 3D(K18A), 3D(K20A) y 3D(KAKA). (A) Análisis electroforético de los productos que resultan de la incorporación de AMP (A) o RMP (R) en el sym/sub UA (en caja amarilla) por las polimerasas indicadas. 10-mer hace referencia al RNA de 10 nucleótidos (sym/sub original) y 11-mer es el RNA producido al ser elongado por la polimerasa (B) Porcentaje de sym/sub elongado en función del tiempo de reacción de 3Dwt (círculos azules), 3D(K18A) (cuadrados naranjas), 3D(K20A) (aspas naranjas) y 3D(KAKA) (triángulos púrpuras), basado en las medidas densitométricas mostradas de las bandas mostradas en (A). En la izquierda se muestra la incorporación de AMP y a la derecha la incorporación de RMP.

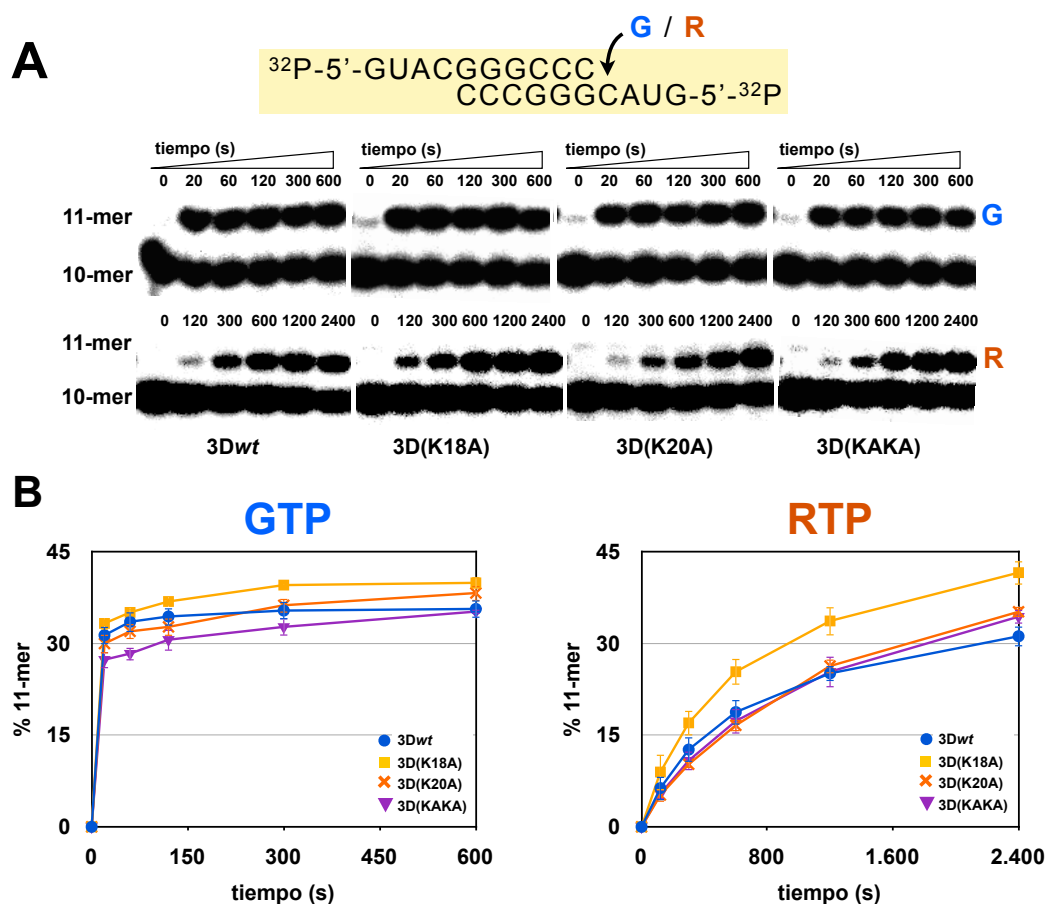


Figura 5.3.15 Incorporación de GMP y RMP en el molde/cebador sym/sub CA por 3Dwt, 3D(K18A), 3D(K20A) y 3D(KAKA). (A) Análisis electroforético de los productos que resultan de la incorporación de GMP (G) o RMP (R) en el sym/sub CA (en caja amarilla) por las polimerasas indicadas. 10-mer hace referencia al RNA de 10 nucleótidos (sym/sub original) y 11-mer es el RNA producido al ser elongado por la polimerasa (B) Porcentaje de sym/sub elongado en función del tiempo de reacción de 3Dwt (círculos azules), 3D(K18A) (cuadrados naranjas), 3D(K20A) (aspas naranjas) y 3D(KAKA) (triángulos púrpuras), basado en las medidas densitométricas de las bandas mostradas en (A). En la izquierda se muestra la incorporación de GMP y a la derecha la incorporación de RMP.

5.3.4 Efecto de la sustitución M16A en la actividad de 3D

Las proteínas descritas en este capítulo de la tesis fueron cristalizadas por Nuria Verdaguer y Cristina Ferrer-Orta, y se analizaron sus estructuras tridimensionales sin y con RNA unido. Los resultados de los análisis estructurales se resumirán en el apartado de Discusión en relación con el comportamiento bioquímico de las 3Ds mutantes. Los datos estructurales sugieren que el aminoácido M16,

perteneciente a la región N-terminal estudiada, podría jugar un papel importante en incorporación de nucleótidos y que un cambio a un aminoácido menos voluminoso (M a A) en este punto podría favorecer incorporaciones incorrectas de nucleótidos. A la vista de esta predicción, se diseñó el clon correspondiente y se expresó y purificó la proteína 3D(M16A) para su caracterización bioquímica.

En colaboración con Celia Perales y Elena Moreno se demostró que, a diferencia de las polimerasas con cambios en los residuos 18 y 20 de 3D, 3D(M16A) no mostró defectos de unión al RNA (Figura 5.3.16) y la actividad enzimática era similar a la de 3Dwt ($19,8 \pm 3,0$ pmol de UMP incorporado/min x μ g de 3D(M16A) frente a $17,4 \pm 5,2$ pmol de UMP incorporado/min x μ g de 3Dwt).

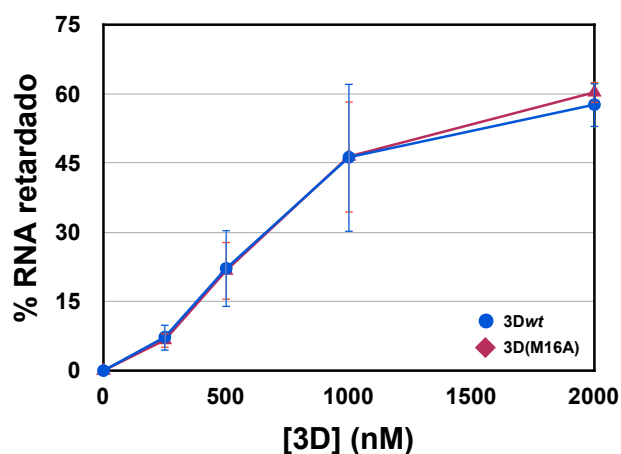


Figura 5.3.16 Análisis de la unión a RNA de 3Dwt y 3D(M16A) mediante retardo en gel. Representación del porcentaje de sym/sub AU marcado (20 nm) que fue retardado en función de la concentración de 3Dwt (círculos azules) y 3D(M16A) (cuadrados fucsias) en un gel de poliacrilamida al 4%.

Los parámetros cinéticos (Figuras 5.3.17, 5.3.18, 5.3.19 y 5.3.20, y Tabla 5.3.2) no muestran cambios significativos en la eficiencia catalítica de 3D(M16A) respecto a 3Dwt, salvo la tasa de incorporación de purinas en segunda posición, que está afectada negativamente por la sustitución M16A (Tabla 5.3.2).

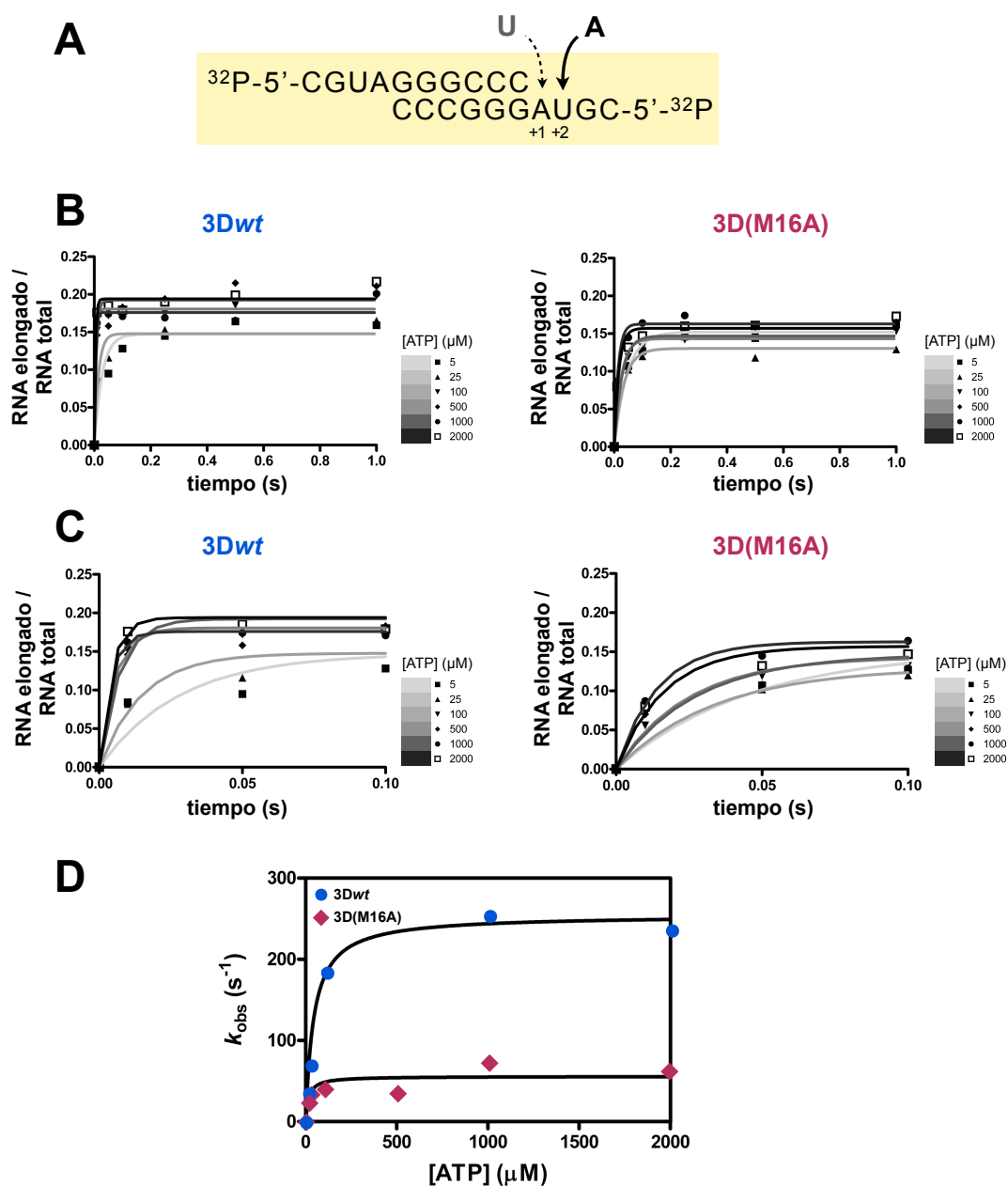


Figura 5.3.17 Cinética de incorporación de AMP sobre sym/sub AU en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt y 3D(M16A). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. (B) Cinética de incorporación de AMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 0,5 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub AU marcado e hibridado y 10 μM de UTP, para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de U en primera posición. El producto de la preincubación se mezcló con ATP empleando el aparato de *quench-flow* y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Ampliación de las gráficas enseñadas en B al intervalo de incorporación de 0,0 a 0,1 segundos. (D) Representación de los valores de k_{obs} de 3Dwt (círculos azules) y 3D(M16A) (cuadrados fucsias) obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) y (C) a una curva exponencial, en función de la concentración de ATP. Los puntos de cada curva se ajustaron a una hipérbola, de la que se obtienen los parámetros cinéticos resumidos en la Tabla 5.3.2.

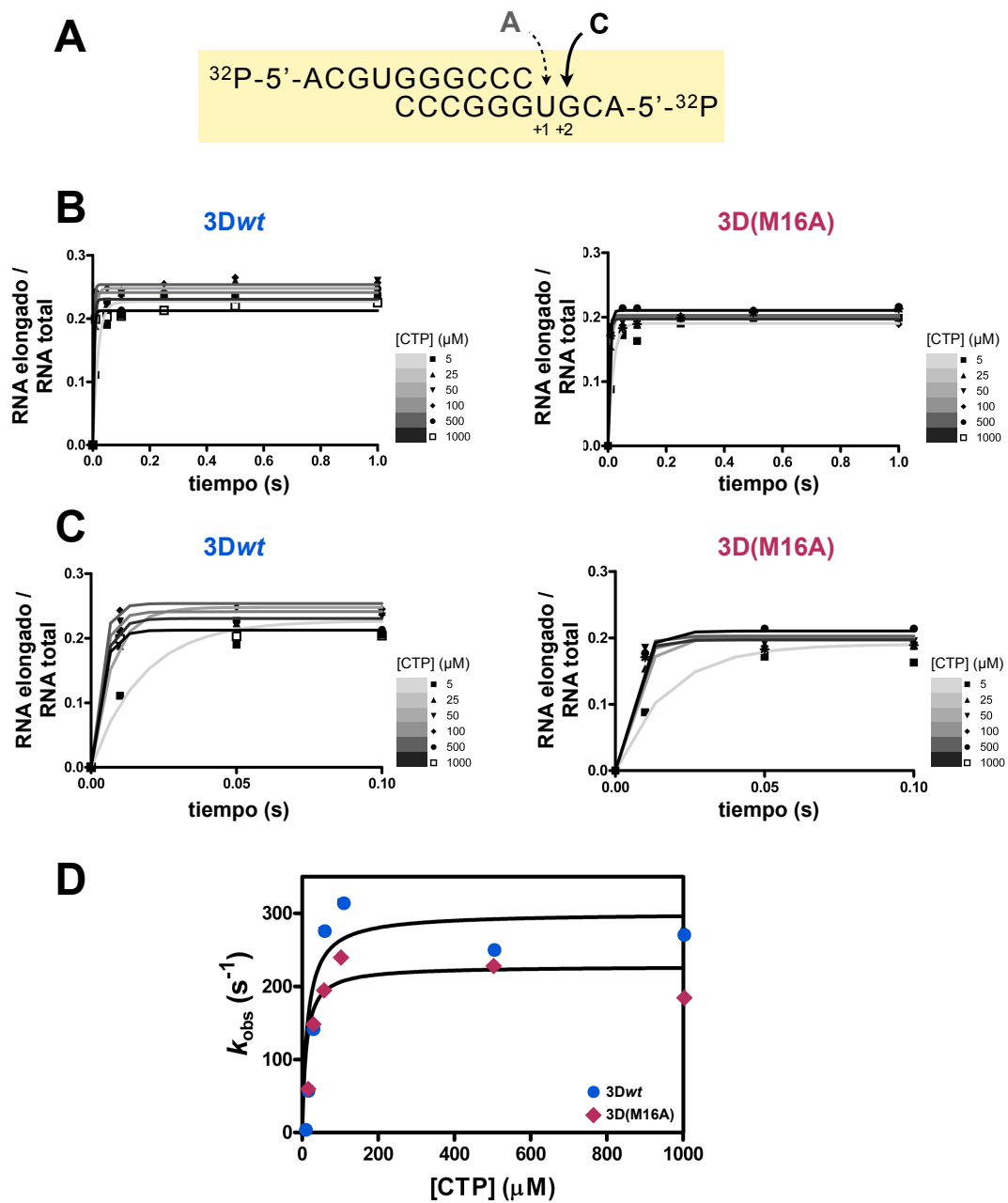


Figura 5.3.18 Cinética de incorporación de CMP sobre sym/sub UG en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt y 3D(M16A). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. (B) Cinética de incorporación de CMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 0,5 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub UG marcado e hibridado y 10 μM de ATP, para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de A en primera posición. El producto de la preincubación se mezcló con CTP empleando el aparato de *quench-flow* y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Ampliación de las gráficas enseñadas en B al intervalo de incorporación de 0,0 a 0,1 segundos. (D) Representación de los valores de k_{obs} de 3Dwt (círculos azules) y 3D(M16A) (cuadrados fucsias) obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) y (C) a una curva exponencial, en función de la concentración de CTP. Los puntos de cada curva se ajustaron a una hipérbola, de la que se obtienen los parámetros cinéticos resumidos en la Tabla 5.3.2.

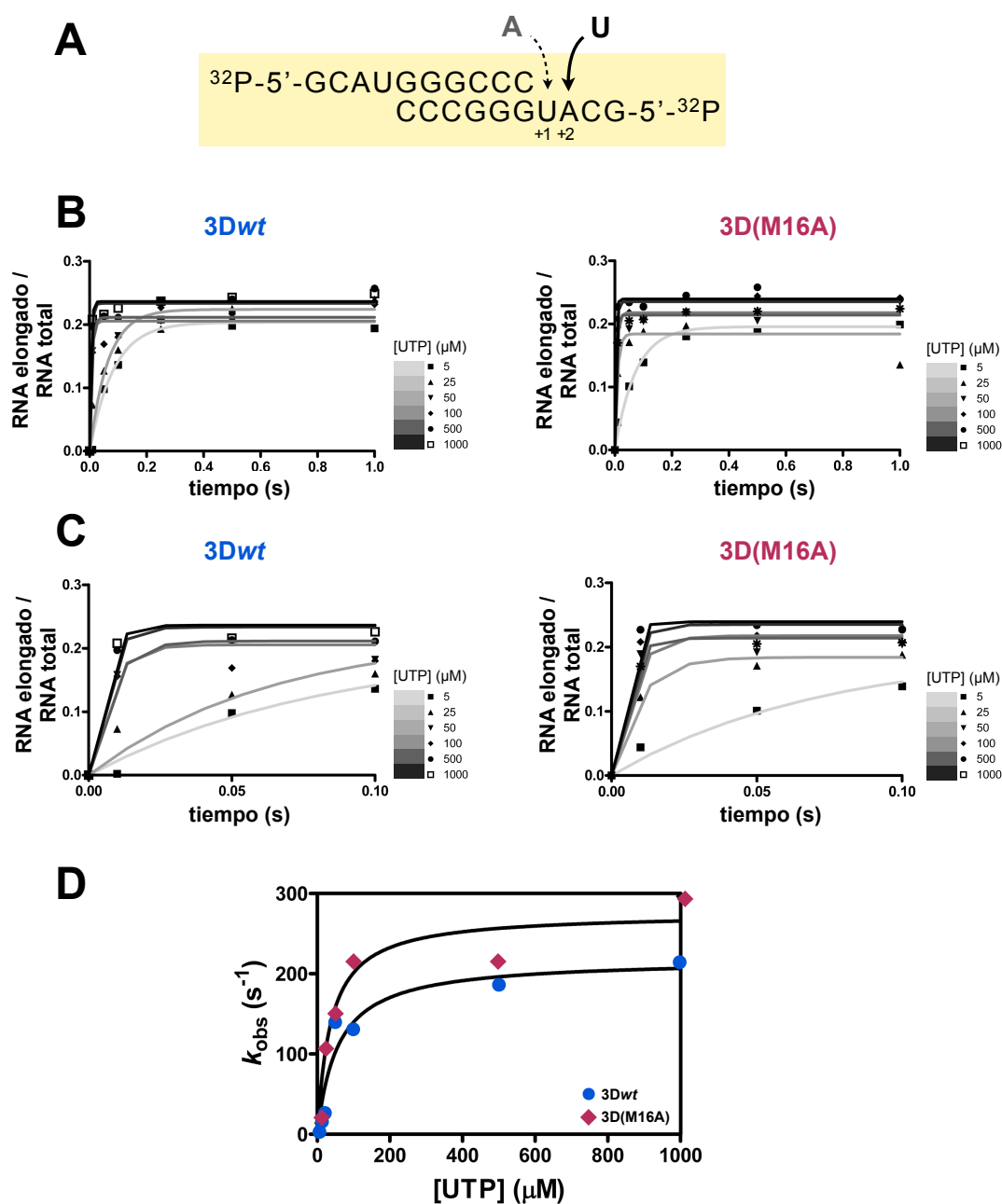


Figura 5.3.19 Cinética de incorporación de UMP sobre sym/sub UA en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt y 3D(M16A). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. (B) Cinética de incorporación de UMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 0,5 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub UA marcado e hibridado y 10 μM de ATP, para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de A en primera posición. El producto de la preincubación se mezcló con UTP empleando el aparato de *quench-flow* y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Ampliación de las gráficas enseñadas en B al intervalo de incorporación de 0,0 a 0,1 segundos. (D) Representación de los valores de k_{obs} de 3Dwt (círculos azules) y 3D(M16A) (cuadrados fucsias) obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) y (C) a una curva exponencial, en función de la concentración de UTP. Los puntos de cada curva se ajustaron a una hipérbola, de la que se obtienen los parámetros cinéticos resumidos en la Tabla 5.3.2.

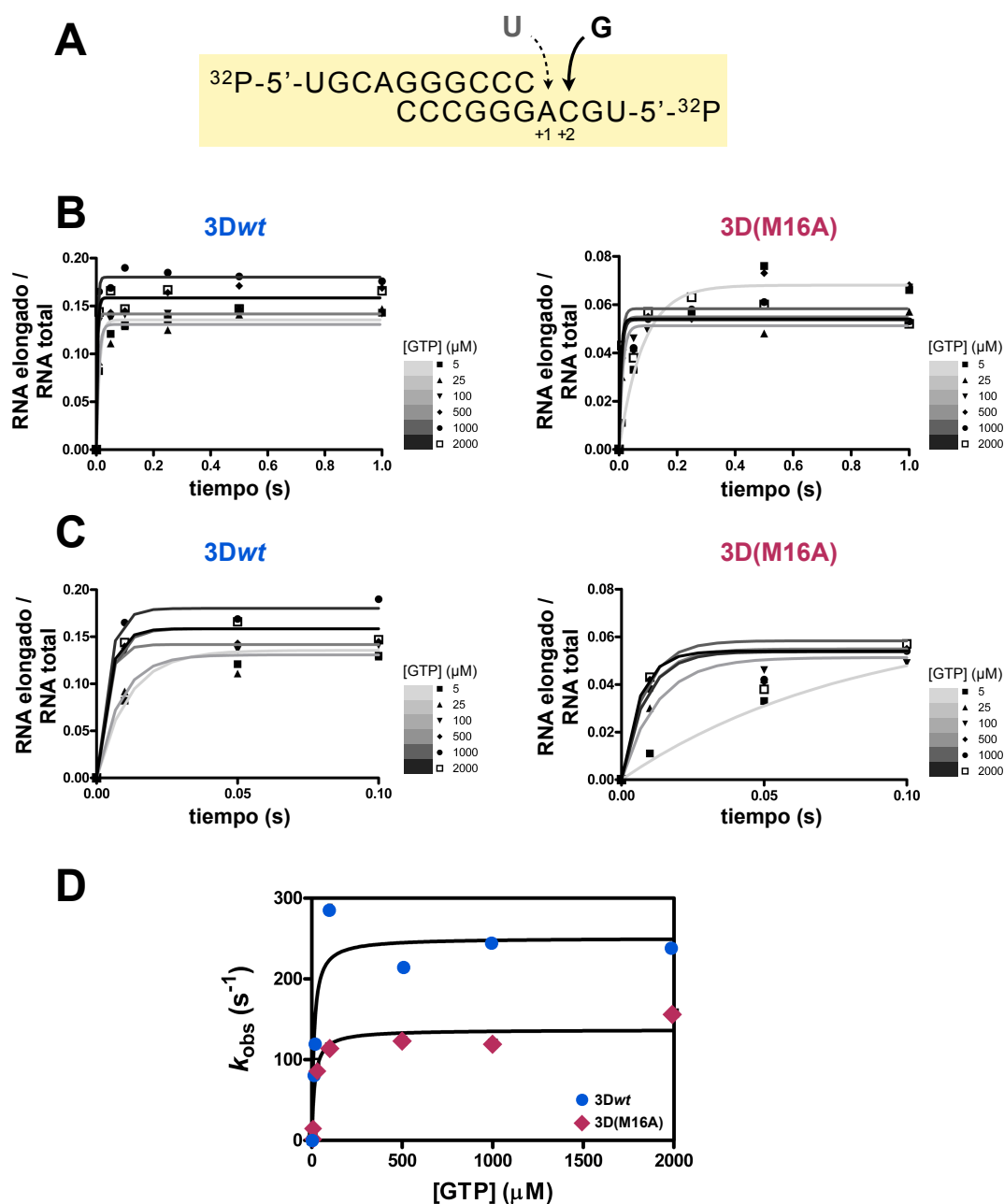


Figura 5.3.20 Cinética de incorporación de GMP sobre sym/sub AC en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt y 3D(M16A). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. (B) Cinética de incorporación de GMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (cantidad equivalente a 0,5 μM de centros activos) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub AC marcado e hibridado y 10 μM de UTP, para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de U en primera posición. El producto de la preincubación se mezcló con GTP empleando el aparato de *quench-flow* y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. Nótese la diferencia de escala entre 3Dwt y 3D(M16A) (C) Ampliación de las gráficas enseñadas en B al intervalo de incorporación de 0,0 a 0,1 segundos. (D) Representación de los valores de k_{obs} de 3Dwt (círculos azules) y 3D(M16A) (cuadrados fucsias) obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) y (C) a una curva exponencial, en función de la concentración de GTP. Los puntos de cada curva se ajustaron a una hipérbola, de la que se obtienen los parámetros cinéticos resumidos en la Tabla 5.3.2.

	3Dwt			3D(M16A)		
	$K_{d,app}^a$ (μM)	k_{pol}^b (s^{-1})	$k_{pol}/K_{d,app}^c$ ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$K_{d,app}^a$ (μM)	k_{pol}^b (s^{-1})	$k_{pol}/K_{d,app}^c$ ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
A sobre sym/sub AU	45	250	5.6	15	55	3.7
C sobre sym/sub UG	15	300	20.0	10	230	23.0
U sobre sym/sub UA	56	220	3.9	54	200	3.7
G sobre sym/sub AC	12	250	12.8	15	150	10.0

Tabla 5.3.2 Parámetros cinéticos de incorporación de nucleótidos de las proteínas 3Dwt y 3D(M16A). Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos a partir de las Figuras 5.3.17-5.3.20. La obtención de los parámetros $K_{d,app}$ y k_{pol} se hizo a partir del ajuste de las k_{obs} en función de la concentración de NTP a una ecuación hiperbólica ($k_{obs} = k_{pol} \times [\text{NTP}] / (K_{d,app} + [\text{NTP}])$), usando regresión no lineal. El significado de cada uno de los parámetros calculados es el siguiente:

^a $K_{d,app}$: Constante de disociación del NTP. El valor es inversamente proporcional a la afinidad de 3D por el sustrato.

^b k_{pol} : Tasa óptima de incorporación del NTP.

^c $k_{pol}/K_{d,app}$: Eficiencia catalítica de la 3D para incorporar un determinado NTP.

5.3.5 Efecto de la sustitución M16A en reconocimiento de nucleótidos

Para investigar si la sustitución M16A causa un descenso en la fidelidad de copia, se estudiaron las cinéticas de incorporación de nucleótidos incorrectos. Los datos obtenidos con el ensayo de incorporación de GMP frente a U en segunda posición (Figura 5.3.21) indican que 3D(M16A) presenta una k_{pol} ($7,8 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$) mayor que 3Dwt ($2,5 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$), aunque la afinidad por el GTP en estas condiciones fue menor para 3D(M16A) ($520 \mu\text{M}$ frente a $290 \mu\text{M}$ de 3Dwt). Al comparar estos datos con los obtenidos para la incorporación del nucleótido correcto, i.e. A frente a U, se comprobó que hay una diferencia de selectividad de 2,7 veces entre 3Dwt ($6,5 \times 10^4$) y 3D(M16A) ($2,4 \times 10^4$), lo que sugiere que 3D(M16A) tiende a copiar el RNA con menor fidelidad de copia.

Cuando se midió incorporación de RMP en primera posición frente a U se observó una mayor incorporación del análogo de nucleótido con 3D(M16A) (Figura 5.3.22), pero la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,3$; ANOVA de dos factores). La incorporación de RMP frente a C fue muy parecida entre las dos

polimerasas ensayadas, siendo ligeramente mayor en 3D(M16A) (Figura 5.3.23) ($p=0,016$; ANOVA de dos factores).

Adicionalmente, se realizaron ensayos de incorporación de RMP en segunda posición para investigar si se podían acentuar las diferencias en el reconocimiento de R entre ambas enzimas. Los resultados muestran nuevamente una mayor incorporación de RMP por parte de 3D(M16A), con diferencias más notables que las observadas al incorporar R en primera posición (Figuras 5.3.24 y 5.3.25) ($p<0,001$; ANOVA de dos factores para R frente a U, y $p=0,017$; ANOVA de dos factores para R frente a C).

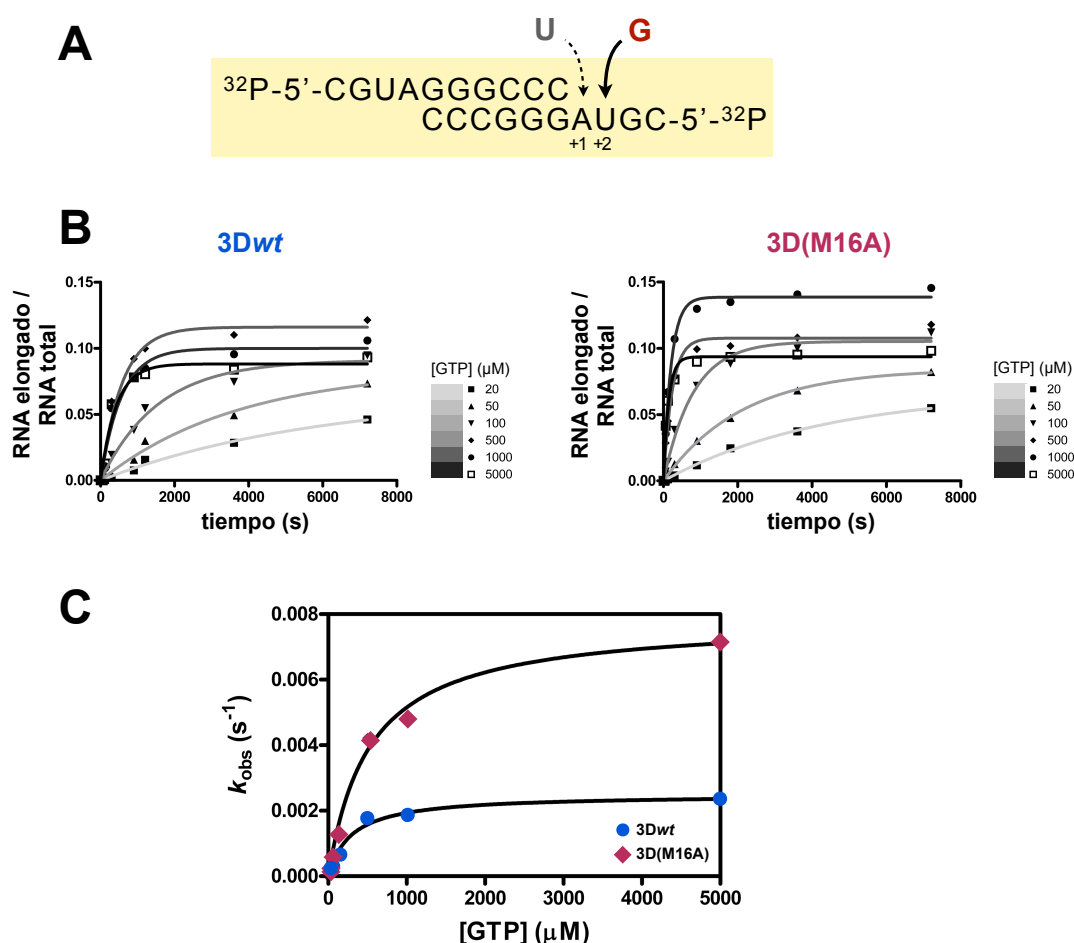
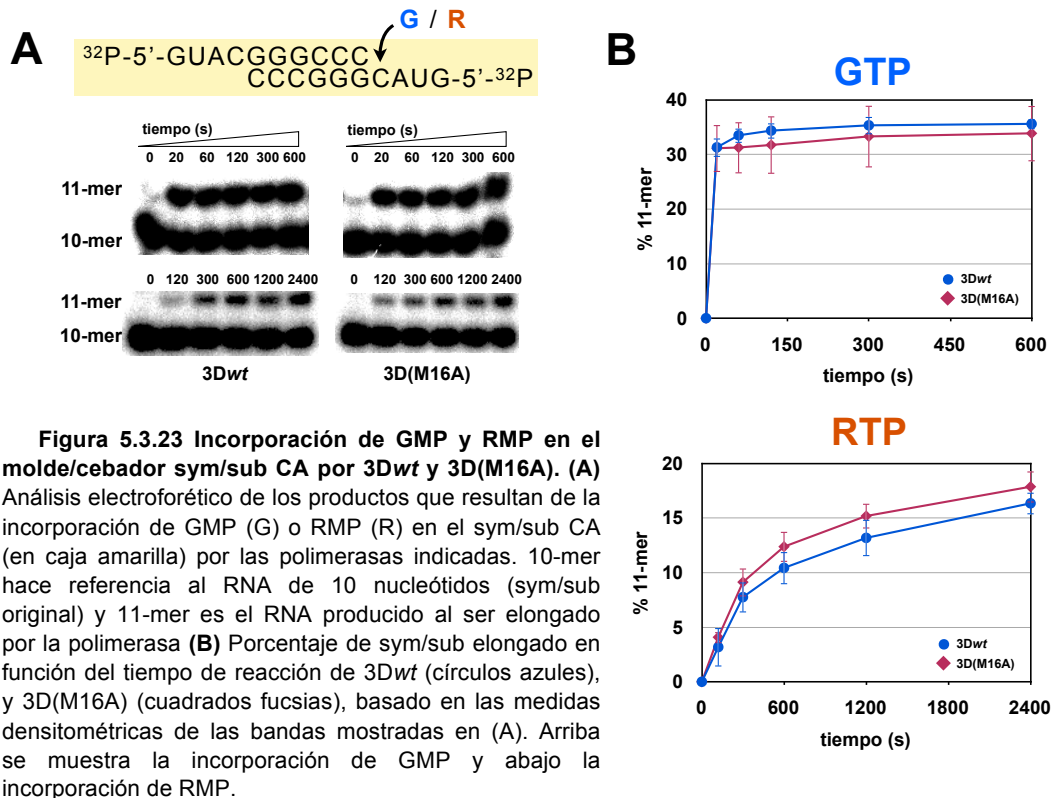
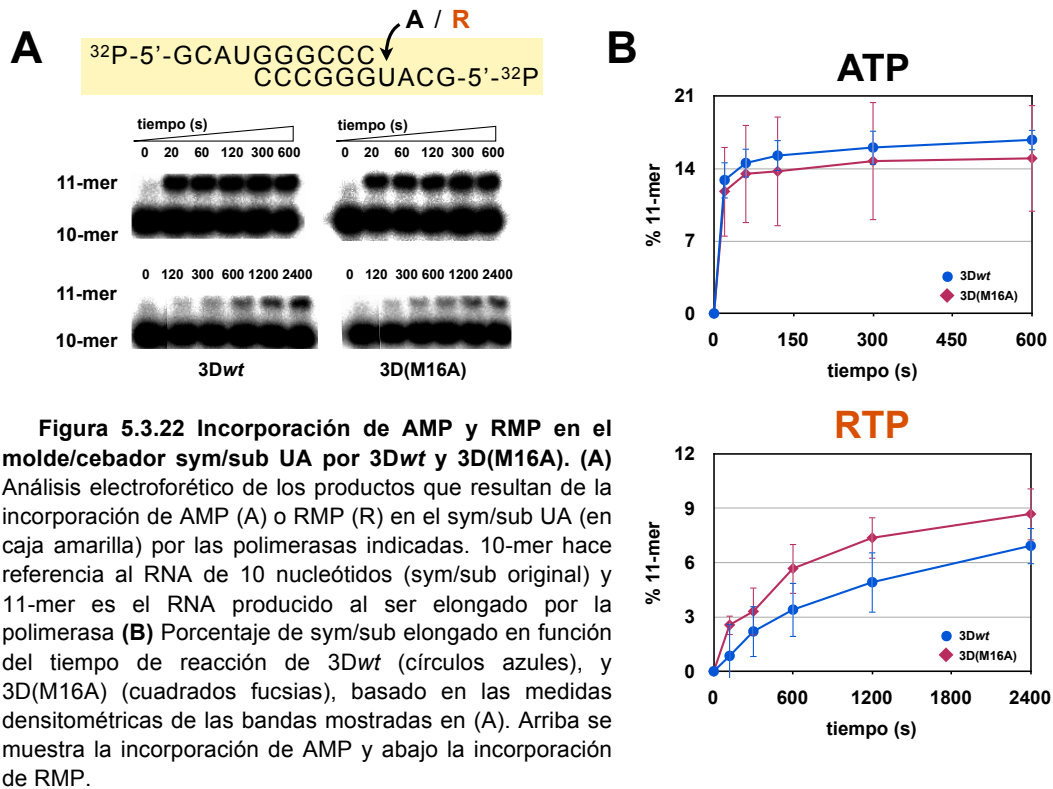


Figura 5.3.21 Cinética de incorporación incorrecta de GMP sobre sym/sub AU en condiciones de estado pre-estacionario con 3Dwt y 3D(M16A). (A) Secuencia del sym/sub empleado e indicación de los nucleótidos que se incorporan. (B) Cinética de incorporación de GMP en función del tiempo y a las distintas concentraciones de sustrato indicadas. La 3D (3 μM) se preincubó durante 900 segundos a 37°C con 0,5 μM de sym/sub AU marcado e hibridado y 10 μM de UTP, para permitir la formación del complejo 3D-RNA y la incorporación de U en primera posición. Al producto de la preincubación se le añadió una mezcla de GTP con 10 μM de molde no marcado (captador) y la reacción se detuvo a distintos tiempos por adición de EDTA. (C) Representación de los valores de k_{obs} de 3Dwt (círculos azules) y 3D(M16A) (cuadrados fucsias) obtenidos al ajustar las cinéticas representadas en (B) a una curva exponencial, en función de la concentración de GTP. Los puntos de cada curva se ajustaron a una hipérbola, de la que se obtienen los parámetros cinéticos que se dan en el texto.



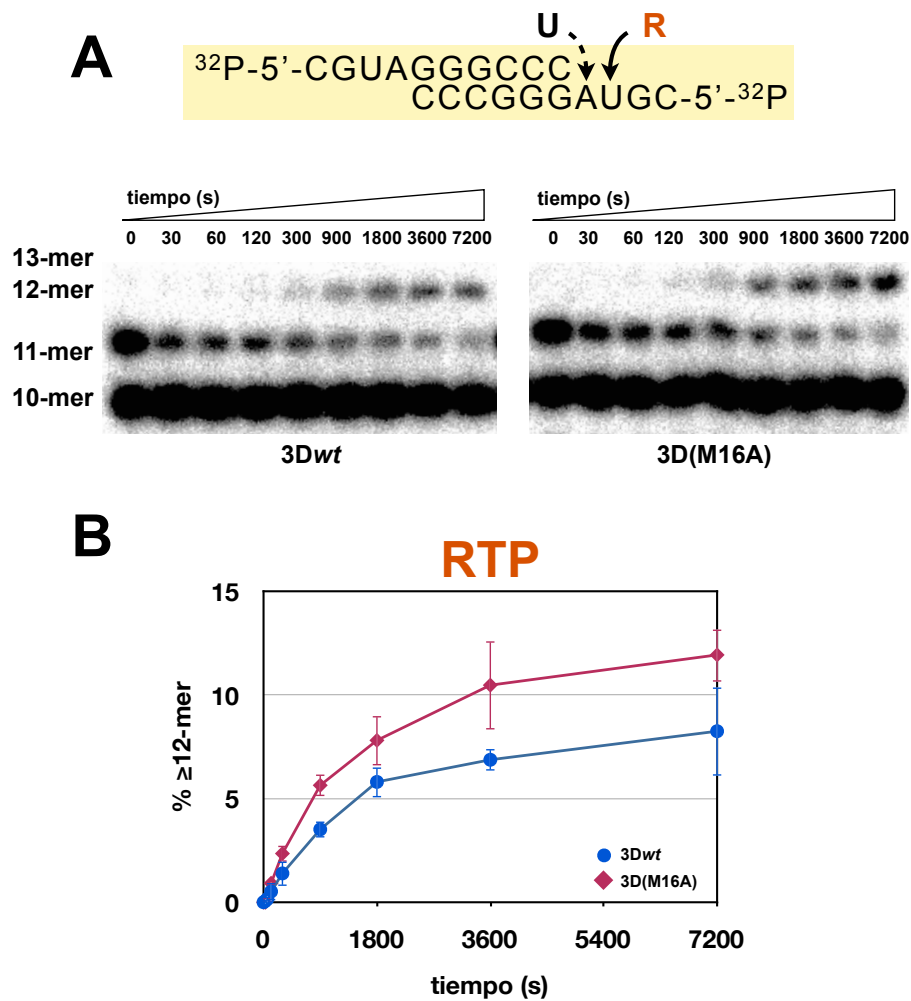


Figura 5.3.24 Incorporación de RMP en la segunda posición del molde/cebador sym/sub AU por 3Dwt y 3D(M16A). (A) Análisis electroforético de los productos que resultan de la incorporación de RMP (R) en el sym/sub AU (en caja amarilla) por las polimerasas indicadas. 10-mer hace referencia al RNA de 10 nucleótidos (sym/sub original), 11-mer es el RNA producido tras preincubar durante 900 segundos con 1 μM de UTP, 12-mer es el RNA producido al añadir 20 μM de RTP para su incorporación en segunda posición y 13-mer es el RNA resultante de la incorporación incorrecta de U o R frente a G (B) Porcentaje de sym/sub elongado con 12 o más nucleótidos, en función del tiempo de reacción, de 3Dwt (círculos azules), y 3D(M16A) (cuadrados fucsias), basado en las medidas densitométricas de las bandas mostradas en (A).

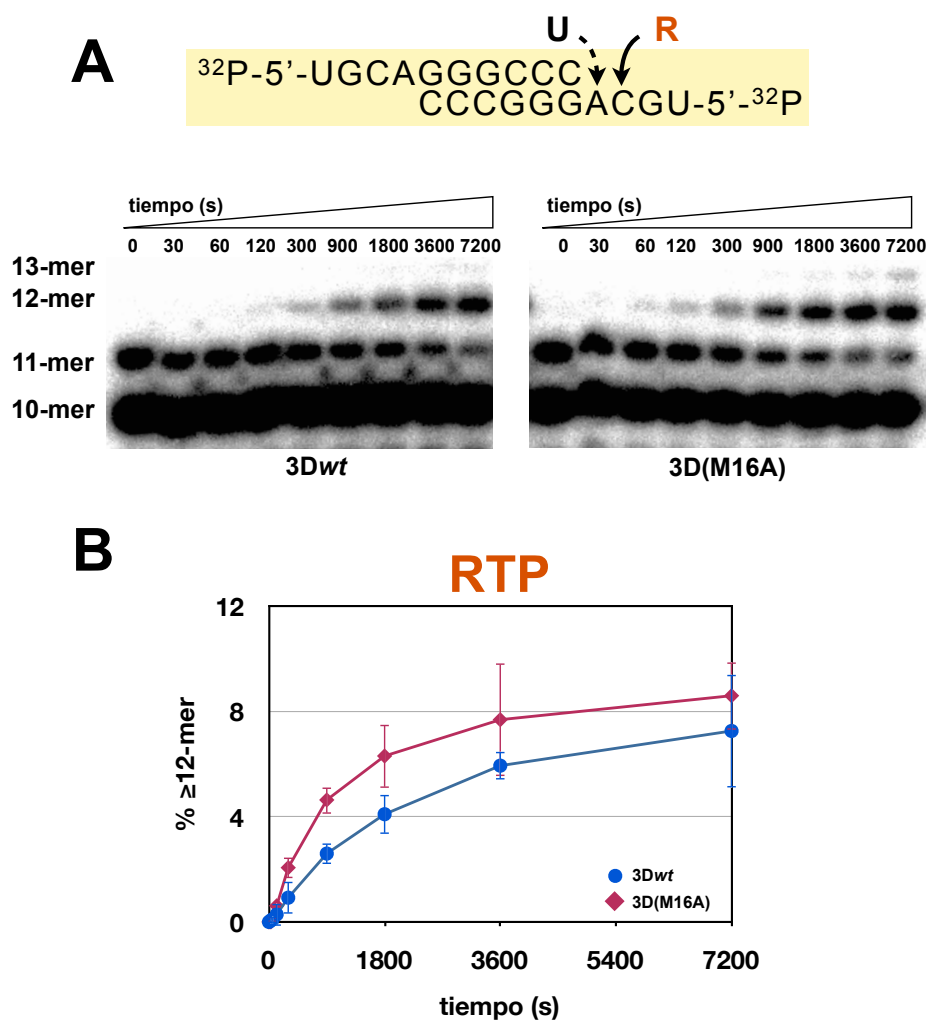


Figura 5.3.25 Incorporación de RMP en la segunda posición del molde/cebador sym/sub AC por 3Dwt y 3D(M16A). (A) Análisis electroforético de los productos que resultan de la incorporación de RMP (R) en el sym/sub AC (en caja amarilla) por las polimerasas indicadas. 10-mer hace referencia al RNA de 10 nucleótidos (sym/sub original), 11-mer es el RNA producido tras preincubar durante 900 segundos con 1 μM de UTP, 12-mer es el RNA producido al añadir 20 μM de RTP para su incorporación en segunda posición y 13-mer es el RNA resultante de la incorporación incorrecta de U o R frente a G (B) Porcentaje de sym/sub elongado con 12 o más nucleótidos, en función del tiempo de reacción, de 3Dwt (círculos azules), y 3D(M16A) (cuadrados púrpuras), basado en las medidas densitométricas de las bandas mostradas en (A).

5.4 Actividad de la proteína 2C del VFA *in vitro*

La proteína 2C del VFA está siendo estudiada en nuestro laboratorio por su papel en resistencia a agentes mutagénicos (Agudo *et al.*, manuscrito en preparación). Al replicar el VFA en presencia de altas concentraciones de R se seleccionó en la proteína 2C la sustitución I248T que, al igual que el mutante SSI (Agudo *et al.*, 2010), evita el desbalance en el patrón de transiciones causado por el mutágeno. Los mecanismos moleculares por los cuales la sustitución I248T causa cambios en las frecuencias de aparición de los distintos tipos de transiciones no han sido aún dilucidados. El interrogante acerca del papel de 2C en respuesta a mutagénesis letal va aún más lejos, pues aún no se conoce el papel concreto de esta proteína en replicación de picornavirus. Estudios filogenéticos sugieren que la proteína 2C puede estar implicada en separación de las hebras de RNA, ya que contiene motivos conservados que colocan a 2C en la familia 3 de las helicasas dentro de la superfamilia de ATPasas AAA+ (Gorbalenya & Koonin, 1988; Gorbalenya *et al.*, 1988; Gorbalenya *et al.*, 1990) (apartado 2.5 de Introducción). A pesar de estas predicciones y de haber observado actividad ATPasa en esta proteína, no se ha descrito la actividad helicasa de 2C de picornavirus, aunque recientemente se ha descrito para el virus de *Ectropis oblicua* (EoV) del orden Picornavirales (Cheng *et al.*, 2013). A continuación se describen los resultados obtenidos con la proteína 2C sometida a ensayos de actividad helicasa.

5.4.1 Clonaje, expresión y purificación de la proteína 2C del VFA con una delección de 33 aminoácidos

Para aumentar la solubilidad de 2C se siguió el procedimiento descrito por Sweeney y colaboradores (2010), en el que delecionaron los primeros 33 residuos, que comprenden una hélice anfipática en la proteína (apartado 4.17.2 de Materiales y Métodos). La proteína recombinante se purificó a partir de extractos de *E. coli* mediante columnas de afinidad (Ni-NTA) que reconocen el péptido de 6 histidinas que está fusionado al extremo N-terminal de 2C. La enzima mostró una pureza de al menos 95% y una masa molecular de aproximadamente 32 KDa, tal como se esperaba (Figura 5.4.1).

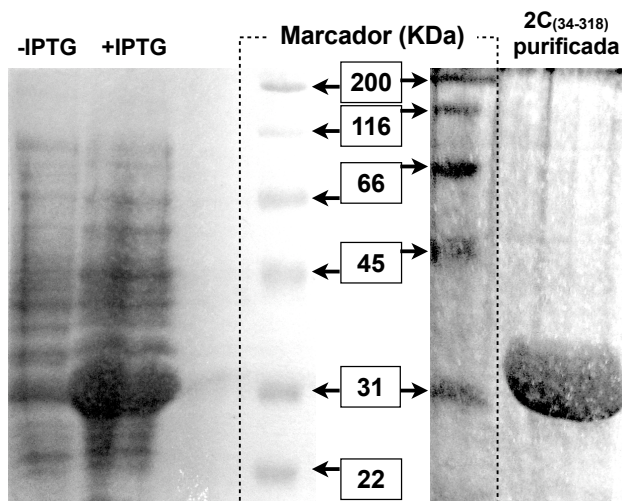


Figura 5.4.1 Expresión y purificación de 2C recombinante del VFA. Análisis por SDS-PAGE de $2C_{(34-318)}$ expresada en *E. coli*. A la izquierda se muestran los extractos celulares de *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido pET28- $2C_{(34-318)}$ sin inducir (primer carril: "-IPTG") o inducidas con 1 mM de IPTG durante 3 horas (segundo carril: "+IPTG"). Se muestran dos carriles con marcador de masa molecular de proteínas (Biorad), uno para el gel de la izquierda, y otro para el gel de la derecha, donde se muestra la proteína $2C_{(34-318)}$ purificada. Las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie.

5.4.2 Actividad ATPasa de $2C_{(34-318)}$

Para comprobar que la proteína 2C de VFA C-S8c1 mantiene su actividad enzimática a pesar de carecer de 33 residuos, se llevaron a cabo ensayos de hidrólisis de ATP (apartado 4.24.1). Los resultados muestran que, tras 2 horas de reacción, el $[^32P]$ ATP presente en la mezcla fue hidrolizado, dando lugar a la aparición de fosfato inorgánico (Figura 5.4.2). Este resultado confirmó que la proteína 2C del VFA mantiene su actividad ATPasa a pesar de la delección de los 33 residuos del N-terminal, como ya fue demostrado previamente para otro VFA (Sweeney *et al.* 2010).

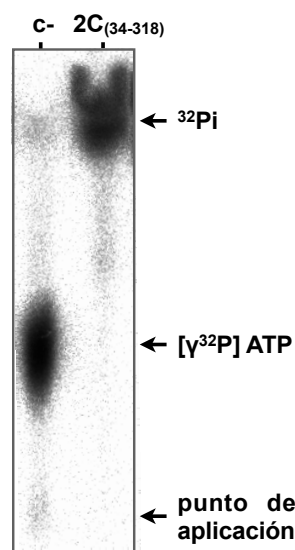


Figura 5.4.2 Actividad ATPasa de $2C_{(34-318)}$. Cromatografía en capa fina de una muestra con $[^32P]$ ATP incubado en ausencia de la proteína 2C (c-) y una muestra en la que $[^32P]$ ATP ha sido incubado durante 2 horas en presencia de $2C_{(34-318)}$. Se observa el ^{32}P liberado por la acción ATPasa de 2C.

5.4.3 Actividad helicasa de 2C₍₃₄₋₃₁₈₎

Ya que la proteína 2C contiene dominios típicos de una helicasa de ácidos nucleicos (Gorbalenya & Lauber, 2010), pero esta actividad no ha sido demostrada bioquímicamente, se ensayó la capacidad de 2C para separar hebras complementarias de DNA y RNA. Estos experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. S. G. Sarafianos en la Universidad de Missouri, bajo la supervisión del Dr. A. O. Adedeji. Aunque los experimentos realizados con RNA no dieron resultados positivos (ver Discusión), los resultados con DNA sí proporcionaron información acerca del posible papel de la proteína 2C en el proceso replicativo del VFA.

En primer lugar y para comprobar que la proteína 2C tiene capacidad para desenrollar ácidos nucleicos, se llevaron a cabo ensayos con el molde de DNA 28mer/28mer bífido (fórmula descrita en la Figura 4.3 de Materiales y Métodos). Según el tipo de helicasa, ésta puede ser cargada en un ácido nucleico de doble banda de distintas formas: valiéndose de un extremo protuberante en 5', de uno en 3', ambos o, simplemente, no necesitar de extremo protuberante alguno. El molde 28mer/28mer bífido permitiría a la proteína 2C ser cargada en el DNA sea cual sea su mecanismo de acción.

Los experimentos con el DNA 28mer/28mer bífido se realizaron como se describe en la Figura 5.4.3.A. Se observó un aumento progresivo de DNA de hebra sencilla en función del tiempo en presencia de la proteína 2C₍₃₄₋₃₁₈₎, mientras que la presencia de 2C^{AAA} (purificada por el Dr. R. Agudo y que contiene 3 sustituciones deletéreas para la enzima) no dio lugar a hebra sencilla de DNA observable tras una hora de incubación (Figura 5.4.3.B). La presencia de EDTA en la mezcla con 2C₍₃₄₋₃₁₈₎ no dio lugar tampoco a producto de separación de hebras, sugiriendo que dicha separación tiene lugar mediante acción enzimática en presencia de un catión (Mg⁺⁺). La helicasa NS3 de HCV sirvió como control positivo del experimento (Figura 5.4.3.B). La desestabilización del DNA de doble banda es directamente proporcional a la concentración de 2C₍₃₄₋₃₁₈₎ (Figura 5.4.3.C).

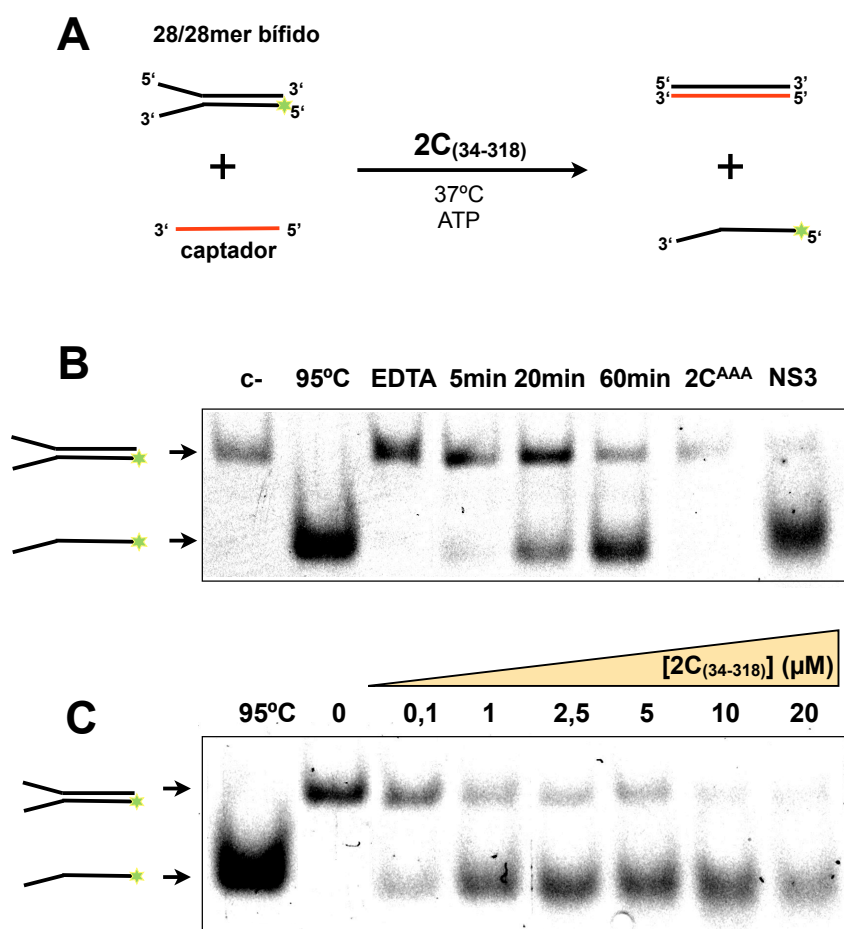


Figura 5.4.3 Separación de hebras de DNA catalizada por $2C_{(34-318)}$. (A) Esquema del procedimiento experimental, descrito en el apartado 4.24.2 de Materiales y Métodos. Se usó un molde de DNA bífido y un captador de DNA (en rojo) con secuencia complementaria a la hebra no marcada. La mezcla con estos componentes fue incubada junto a $2C_{(34-318)}$ y ATP a 37°C , con la consecuente liberación de la cadena de DNA marcada (la estrella verde representa el marcaje fluorescente con cianina). (B) Gel nativo de poliacrilamida al 6%, donde se resolvieron los productos de la reacción esquematizada en (A). Se emplearon $3\text{ }\mu\text{M}$ de $2C_{(34-318)}$. En el primer carril se muestra la mezcla sin 2C (c-), en el segundo carril la mezcla sin 2C calentada a 95°C durante 5 minutos para la desnaturalización del DNA, en el tercero se añadió EDTA a la mezcla de reacción. En los siguientes 3 carriles se resolvieron los productos de la reacción con $3\text{ }\mu\text{M}$ de $2C_{(34-318)}$ a distintos tiempos. A continuación se muestra la mezcla incubada con $2C^{\text{AAA}}$, que carece de actividad ATPasa y en el último carril un control positivo de la helicasa de HCV NS3. (C) Gel nativo de poliacrilamida al 6%, donde se resolvieron los productos de la reacción esquematizada en (A) tras 60 minutos de reacción en presencia de distintas concentraciones de $2C_{(34-318)}$. En el primer carril se resolvió la muestra calentada a 95° .

5.4.4 Requerimientos del molde para la separación de la doble hebra por la proteína 2C₍₃₄₋₃₁₈₎

Con el objetivo de saber qué clase de ácidos nucleicos pueden ser desenrollados por la proteína 2C, se realizó un estudio con 3 tipos de moldes de DNA: un molde con extremo protuberante en 5' (31/18mer), un molde con extremo protuberante en 3' (19/28mer) y un molde con extremos romos (28/28mer) (Figura 4.3; Figura 5.4.4.A). Los resultados (Figura 5.4.4.B) muestran que la proteína 2C₍₃₄₋₃₁₈₎ es capaz de separar las dos hebras de un molde de DNA cuando éste presenta un extremo protuberante en 5', pero no cuando el extremo está situado en 3', a diferencia de lo que hace la proteína NS3 de HCV. Ninguna de las 2 proteínas fue capaz de desestabilizar el molde romo 28/28mer.

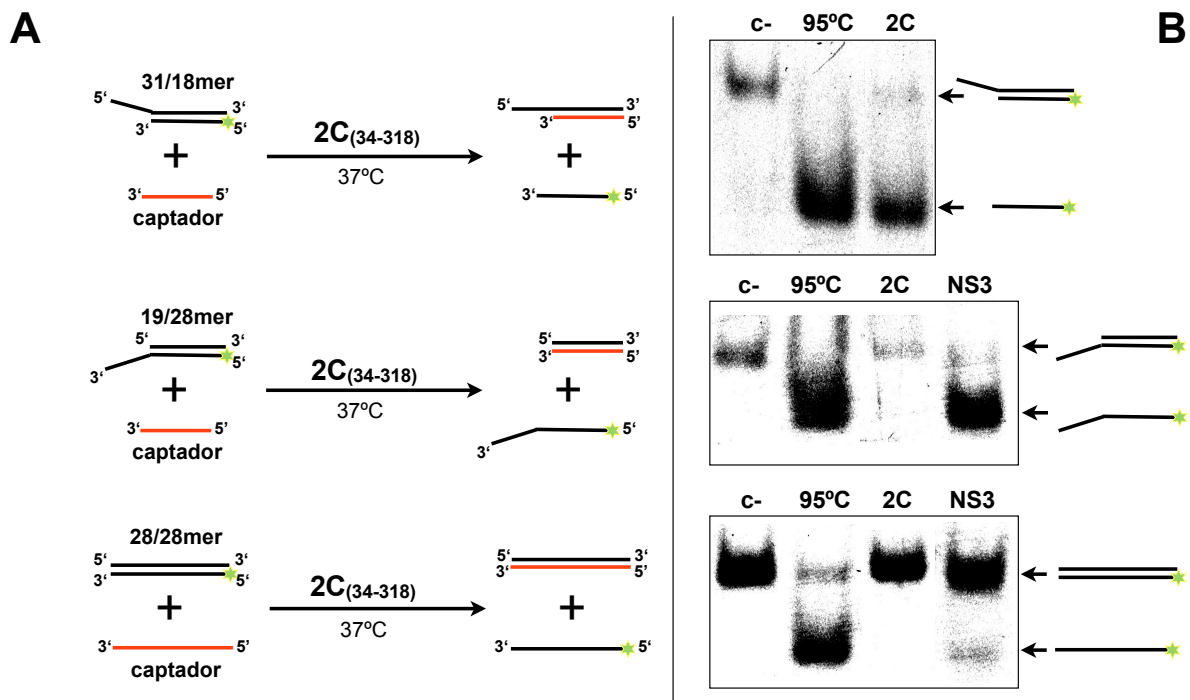


Figura 5.4.4 Separación de hebras de DNA por 2C₍₃₄₋₃₁₈₎ empleando distintos moldes (A) Esquema de las reacciones de desnaturalización de DNA. Se usaron los moldes dibujados a la izquierda. El captador de DNA (en rojo) usado en cada caso tiene una secuencia complementaria a la hebra no marcada. La mezcla con estos componentes fue incubada junto a 3 μ M de 2C₍₃₄₋₃₁₈₎ a 37°C, con la consecuente liberación de la cadena de DNA marcada (la estrella verde representa el marcaje fluorescente con cianina). **(B)** Geles nativos de poliacrilamida al 6%, donde se resolvieron los productos de las reacciones esquematizadas en (A). En el primer gel se aprecia la actividad de separación de hebra por 2C y en los otros 2 no se detectó actividad. En todos ellos se resolvió en el primer carril la muestra sin 2C (c-) (DNA nativo) y en el segundo carril la muestra calentada a 95° (DNA desnaturalizado). NS3 de HCV se empleó como control de la actividad helicasa sobre un molde con extremo protuberante en 3'.

Para determinar cómo de extenso ha de ser el extremo protuberante, se llevó a cabo un experimento con 3 moldes con extremos protuberantes en 5' de distintas longitudes: un molde con 13 nucleótidos desapareados (31/18mer) (igual que en el experimento anterior), un molde con 5 nucleótidos desapareados (23/18mer) y un molde con tan sólo 3 nucleótidos desapareados (21/18mer). Los resultados (Figura 5.4.5) muestran actividad con los 3 tipos de molde, aunque se observa menor proporción de producto de separación de hebra cuando el extremo protuberante es corto.

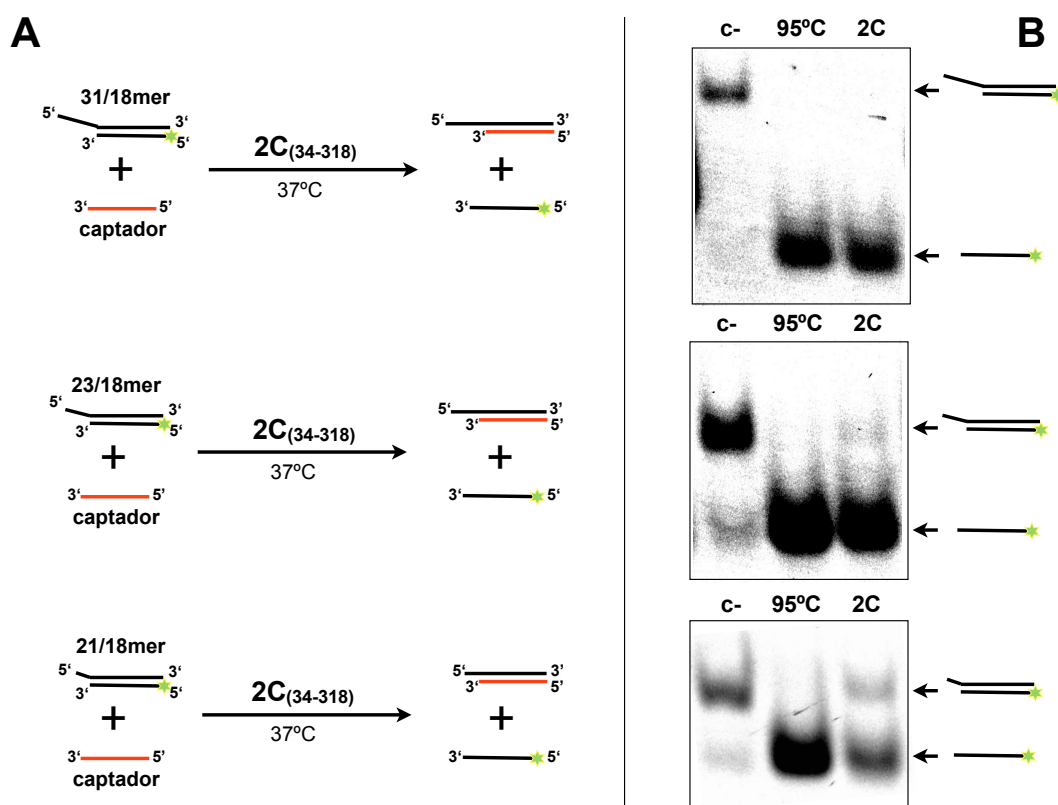


Figura 5.4.5 Separación de hebras de DNA por 2C₍₃₄₋₃₁₈₎ empleando moldes con extremos protuberantes en 5' de distintas longitudes (A) Esquema de las reacciones de desnaturalización de DNA. Se usaron los moldes indicados a la izquierda. El captador de DNA (en rojo) usado en cada caso tiene una secuencia complementaria a la hebra no marcada. La mezcla con estos componentes fue incubada junto a 3 μ M de 2C₍₃₄₋₃₁₈₎ a 37°C, con la consecuente liberación de la cadena de DNA marcada (la estrella verde representa el marcaje fluorescente con cianina). **(B)** Geles nativos de poliácridamida al 6%, donde se resolvieron los productos de las reacciones esquematizadas en (A). En todos ellos se resolvió en el primer carril la muestra sin 2C (c-) (DNA nativo) y en el segundo carril la muestra calentada a 95° (DNA desnaturalizado). Se observa separación de hebras en todos los casos.

5.4.5 Requerimientos energéticos de la proteína 2C₍₃₄₋₃₁₈₎ para desestabilizar ácidos nucleicos

Las helicasas de RNA se caracterizan porque hidrolizan ATP en el proceso de separación de hebras. La proteína 2C del VFA tiene actividad ATPasa, pero la función de esta propiedad en esta enzima sigue siendo una incógnita. Se realizaron ensayos de separación de hebras de DNA tanto en ausencia como en presencia de 2,5 mM ATP. La actividad de 2C₍₃₄₋₃₁₈₎ no se vio afectada por la ausencia de ATP (Figura 5.4.6). Este tipo de actividad se asemeja al descrito para la 2C del virus de *Ectropis Oblicua* (Cheng *et al.*, 2013), más propio de chaperonas de ácidos nucleicos que de helicasas.

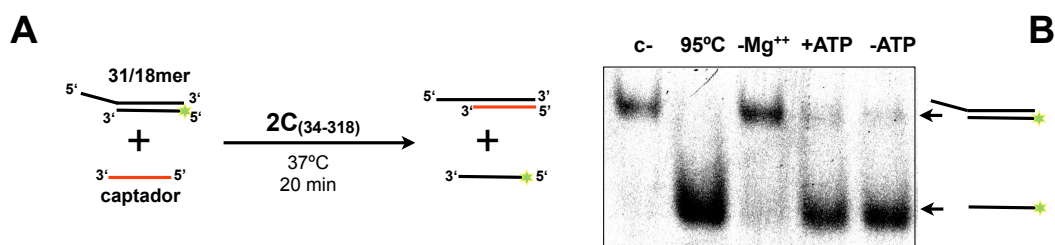


Figura 5.4.6 Separación de hebras de DNA por 2C₍₃₄₋₃₁₈₎ en ausencia y presencia de ATP (A) Esquema de las reacciones de desnaturalización de DNA. Se usó un molde de DNA bífido y un captador de DNA (en rojo) con secuencia complementaria a la hebra no marcada. La mezcla con estos componentes fue incubada junto a 3 μ M de 2C₍₃₄₋₃₁₈₎ a 37°C, con la consecuente liberación de la cadena de DNA marcada (la estrella verde representa el marcaje fluorescente con cianina). **(B)** Gel nativo de poliacrilamida al 6%, donde se resolvieron los productos de las reacciones cuyo procedimiento está esquematizado en (A). En el primer carril se resolvió la muestra sin 2C (c-) y en el segundo carril la muestra calentada a 95°. En ausencia de Mg⁺⁺ no se vio separación de hebra, pero sí tanto en ausencia como en presencia de ATP.

El ATP, no sólo es prescindible para la desestabilización del DNA por 2C₍₃₄₋₃₁₈₎, sino que inhibe esta actividad cuando se encuentra en concentraciones elevadas (Figura 5.4.7).

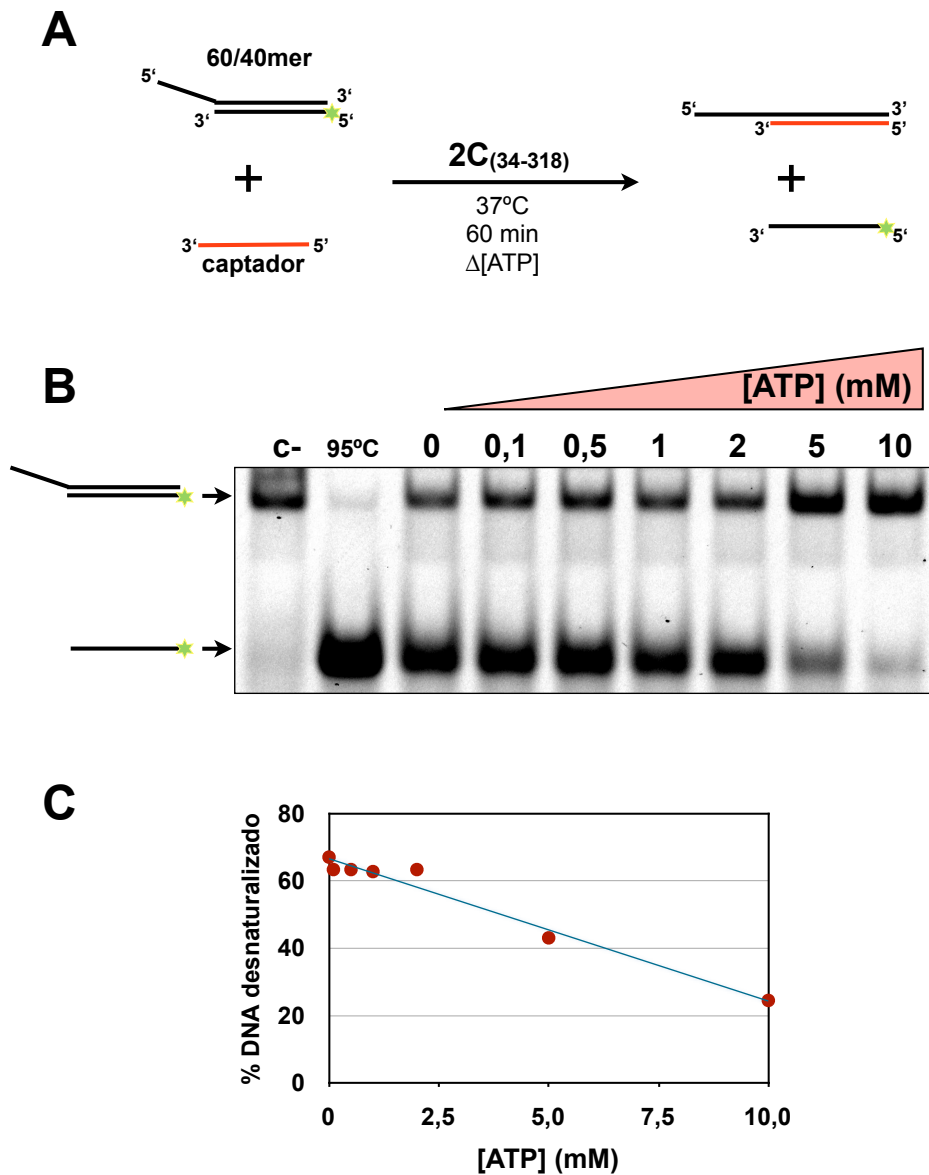


Figura 5.4.7 Separación de hebras de DNA por 2C₍₃₄₋₃₁₈₎ en presencia de distintas concentraciones de ATP (A) Esquema de las reacciones de desnaturalización de DNA. Se usó un molde de DNA con un extremo protuberante de 20 nucleótidos en 5' (60/40mer) y un captador de DNA (en rojo) con secuencia complementaria a la hebra no marcada. La mezcla con estos componentes fue incubada junto a 3 μ M de 2C₍₃₄₋₃₁₈₎ a 37°C, con la consecuente liberación de la cadena de DNA marcada (la estrella verde representa el marcaje fluorescente con cianina). (B) Gel nativo de poliacrilamida al 6%, donde se resolvieron los productos de las reacciones cuyo procedimiento está esquematizado en (A). En el primer carril se resolvió la muestra sin 2C (c-) (DNA nativo) y en el segundo carril la muestra calentada a 95° (DNA desnaturalizado). En los carriles siguientes se resolvieron las muestras incubadas con concentraciones crecientes de ATP, observándose una disminución de actividad al aumentar la concentración de ATP. (C) Representación gráfica del porcentaje de DNA desnaturalizado en función de la concentración de ATP, basada en las medidas densitométricas de las bandas mostradas en (B).

6 Discusión

6.1 Análisis de las sustituciones M296I y G62S, implicadas en resistencia a ribavirina (R)

La gran diversidad genética de las poblaciones de virus RNA (cuasiespecies) les confiere una gran capacidad de adaptación, lo que dificulta el control de las enfermedades causadas por estos agentes infecciosos (Baranowski *et al.*, 2003; Domingo *et al.*, 2012). Las altas tasas de mutación de los virus RNA permiten que las poblaciones virales estén compuestas por multitud de variantes susceptibles de selección positiva de aquellas más ventajosas ante una determinada presión selectiva, como puede ser la presencia de un compuesto antiviral. Por este motivo surgió la necesidad de explorar estrategias antivirales que tuvieran en cuenta la dinámica de cuasiespecies. Para que no haya pérdidas de la información genética durante la replicación del virus, la tasa de mutación ha de ser mantenida por debajo de un umbral de error (Domingo *et al.*, 2012). La mutagénesis letal es la estrategia antiviral que consiste en llevar la tasa de mutación de un virus por encima de dicho umbral de error, para que la población viral entre en catástrofe de error, un colapso sin retorno de la información genética del virus (Eigen, 2002; Perales *et al.*, 2011).

6.1.1 La sustitución G62S es deletérea para el VFA

Los virus RNA encuentran formas de escapar a la mutagénesis letal inducida por nucleótidos mutagénicos. El tratamiento con ribavirina (R), un análogo de purinas que actúa como mutágeno en picornavirus y otros virus RNA, dio lugar a la selección de la sustitución G64S en la polimerasa de PV (Pfeiffer & Kirkegaard, 2003; Vignuzzi *et al.*, 2006) y a la selección de la sustitución M296I en la polimerasa del VFA (Sierra *et al.*, 2007). El cambio G64S causa en PV un aumento de la fidelidad de copia de la polimerasa del virus, de tal forma que disminuye la incorporación de RMP y su efecto mutagénico (Pfeiffer & Kirkegaard, 2003; 2005).

El VFA con la sustitución G62S (equivalente a la sustitución G64S de PV) mostró inestabilidad genética en pases llevados a cabo en ausencia de R, lo que indica que G62S supone un coste de eficacia biológica al virus y quizás por este motivo no llegó a seleccionarse en los pases realizados con el VFA en presencia de R. Los experimentos bioquímicos realizados con 3D(G62S) muestran que esta sustitución está afectando a la unión a RNA (Ferrer-Orta *et al.*, 2010), a la actividad específica de polimerización de 3D y a la reacción de uridilación de VPg (Figura 5.1.6 y Figura 5.1.7).

Datos estructurales obtenidos en el laboratorio de la Dra. Nuria Verdaguer muestran que el cambio G62S en la polimerasa del VFA afecta a la flexibilidad del bucle $\beta 9$ - $\alpha 11$ de 3D, resultando en un centro activo más rígido. Además, G62S ayuda a cerrar el extremo N-terminal de la polimerasa en una conformación también más rígida (Ferrer-Orta *et al.*, 2010). Estos cambios podrían ser los que están afectando a la unión al RNA y, por tanto, a la actividad enzimática de 3D, lo que hace que la sustitución G62S sea desventajosa para el VFA. Los datos bioquímicos con 3D(G62S-M296I) no muestran mejoras de actividad respecto a 3D(G62S), lo que indica que la sustitución M296I no parece compensar los defectos causados por el cambio G62S sobre la polimerasa. No obstante, la sustitución G62S en el contexto de pMT28-3D(G62S-M296I) no mostró inestabilidad genética (Ferrer-Orta *et al.*, 2010).

Al pasar el virus con ambas sustituciones pMT28-3D(G62S-M296I) tanto en ausencia como en presencia de R, se encontraron dos nuevos cambios en proteínas no estructurales del virus: la sustitución I85V en la proteína 2C y la sustitución F350L en 3D. El residuo 350 se encuentra en el motivo D de la polimerasa, que consiste en una hélice cuya flexibilidad es importante para la dinámica molecular de 3D (Shen *et al.*, 2012). El cambio de un residuo con un anillo aromático (F) por uno menos grande (L) podría haber ayudado a restaurar la flexibilidad de la polimerasa causada por la sustitución G62S, una posibilidad que requiere investigaciones adicionales.

6.1.2 Las sustituciones M296I y G62S confieren al VFA menor sensibilidad a la acción mutagénica de R

Cuando comparamos la producción viral de pMT28wt, pMT28-3D(M296I), pMT28-3D(G62S) y pMT28-3D(G62S-M296I) pasados en presencia de R con la producción viral de las poblaciones pasadas en ausencia de R, observamos que las

poblaciones con cambios en la polimerasa muestran menor descenso en el título viral que el virus *wt* (Figura 5.1.2). Para saber si la menor sensibilidad a R observada en los virus mutantes se debe a una menor capacidad de incorporar R en el RNA por parte de las polimerasas, se llevaron a cabo los experimentos de incorporación de RMP descritos en el apartado 5.1.3. Los resultados indicaron que 3D(M296I), 3D(G62S) y 3D(G62S-M296I) incorporaban R más lentamente que la enzima *wt*, bien sea frente a C (Figura 5.1.4) como frente a U (Figura 5.1.5), siendo las polimerasas con la sustitución G62S las que menos RMP incorporaron. Estos datos guardan relación con lo observado en los virus mutantes pasados en presencia de R, lo que sugiere que la menor sensibilidad a R observada en los virus mutantes se debe a una capacidad de las polimerasas con los cambios M296I y G62S a discriminar nucleótidos de forma más fidedigna que 3D*wt*. Además, hemos observado que 3D*wt* incorpora RMP más eficientemente frente a C que frente a U, lo que podría explicar el aumento en el sesgo mutacional a favor de las transiciones G→A y C→U observado en los virus pasados en presencia de R (ver Figura 2.12). A pesar de estos resultados, no podemos excluir que al sesgo mutacional contribuya el descenso en los niveles de GTP intracelular causados por la inhibición por R de la enzima IMPDH (Figura 2.11; Airaksinen *et al.*, 2003).

La sustitución M296I produjo un descenso de la tasa de mutación del virus pasado en presencia de R, pero no en su ausencia (Sierra *et al.*, 2007). Además, 3D(M296I) mostró una eficiencia de incorporación de nucleótidos incorrectos similar a 3D*wt* (Arias *et al.*, 2008). Estos datos indican que el cambio M296I no produce un aumento generalizado de la fidelidad de copia de 3D, sugiriendo que la supresión parcial del efecto mutagénico de R tiene lugar mediante un mecanismo más específico. En la estructura tridimensional de 3D(M296I) se observó un cambio conformacional del ácido aspártico catalítico D245 asociado a la presencia de isoleucina en la posición 296, situada en el bucle β9-α11 de 3D. La cadena lateral de D245 queda entonces en la zona donde se posiciona el RTP antes de ser incorporado en el RNA. Este cambio causaría un impedimento estérico a la entrada de RTP, lo que podría explicar la discriminación en la incorporación de RMP observada (Ferrer-Orta *et al.*, 2010). Lo que aún no sabemos es si G62S produce en la polimerasa del VFA un aumento de la fidelidad de copia y los datos estructurales no aportan información concreta que explique la reducción en la incorporación de RMP, salvo la pérdida de flexibilidad descrita arriba. Una mayor rigidez ya fue observada en la polimerasa 3D(G64S) de PV y se conjeturó acerca de su papel en fidelidad (Marcotte *et al.*, 2007). La relación entre rigidez estructural y fidelidad de copia ha sido también propuesta en

polimerasas de DNA (Kim *et al.*, 2006; Osheroff *et al.*, 1999) y la RT del VIH (Harris *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999).

6.2 Sustitución V173I y adaptación a 5-fluorouracilo

6.2.1 Aparición y selección de V173I

El 5-fluorouracilo (FU) es un análogo de uracilo que difiere de este en un átomo de flúor (Figura 2.13). A pesar de la diferencia tan sutil, el FU es capaz de aumentar la tasa de mutación de un virus al ser incorporado —en su forma nucleotídica— en el RNA viral, probablemente por las reorganizaciones electrónicas inducidas por el átomo de FU (Agudo *et al.*, 2009). Hasta hace muy poco no se habían descrito mutaciones en 3D que surgiesen como consecuencia de la adaptación del virus a este compuesto. Esto podría deberse a las similitudes estructurales entre FU y U, que hacen que se requiera de una precisión muy fina por parte de la enzima para la discriminación entre ambas moléculas y solo pocos cambios en la estructura de la polimerasa podrían ayudar a tal fin. Otra alternativa es la aparición de mutaciones que causen alteraciones en la fidelidad general de la enzima, que es lo que provoca la sustitución R84H, aparecida al pasar el VFA en presencia de FU (Zeng *et al.*, 2013). La sustitución V173I no provoca cambios sustanciales en la infectividad del VFA, tan solo un incremento de la eficacia biológica del virus al ser tratado con FU durante varios pases en cultivos celulares.

La mutación G7126A (que da lugar a la sustitución V173I en 3D) se seleccionó tras haber pasado la población MARLS del VFA (Charpentier *et al.*, 1996) en presencia de concentraciones crecientes de R, haber interrumpido el tratamiento durante 5 pases, y luego tratar con 200 µg/ml de FU. Las transiciones A→G y U→C predominan en las poblaciones del VFA pasadas en cultivos celulares en nuestro laboratorio. Esto cambia cuando el virus es tratado con R, que invierte el patrón de transiciones del virus, aumentando la probabilidad de encontrar transiciones G→A y C→U (Agudo *et al.*, 2010). Por esta razón pensamos que el tratamiento previo de MARLS con R, que además expande el espectro de mutantes del virus, podría haber ayudado a la aparición de G7126A.

6.2.2 La sustitución V173I estabiliza el patrón de transiciones del virus pasado en presencia de FU, mediante modulación de los parámetros de incorporación de nucleótidos

Cuando el VFA es pasado en cultivos celulares en presencia de FU, se produce un incremento de las transiciones A→G y U→C, seguramente debido a una mayor incorporación de FU frente a A que frente a G (Figura 2.16 y Tabla 5.2.3). Al pasar el virus silvestre 10 veces en presencia de FU, el porcentaje de transiciones A→G y U→C aumentó de un 67% a un 84%. Sin embargo, el virus mutante redujo dicho porcentaje de un 76% en ausencia de FU a un 73% (Figura 5.2.7), manteniendo el balance entre tipos de transiciones que se da en ausencia de agentes mutagénicos. A pesar de esto, no se encontraron diferencias significativas en las tasas de mutación de ambos virus pasados tanto en ausencia como presencia de FU, aunque en ambos casos la tasa de mutación de pMT28-3D(V173I) fue algo menor que la del virus silvestre.

Para tratar de encontrar el mecanismo molecular por el cual el virus con la sustitución V173I es capaz de mantener baja la proporción de transiciones A→G y U→C, se realizaron ensayos de extensión de molde para determinar los parámetros cinéticos de incorporación de distintos nucleótidos (resumidos en la Tabla 5.2.3). Los valores de selectividad indicaron que 3D(V173I) tiene una capacidad de discriminar entre UTP y FUTP 6 veces mayor que 3Dwt en el contexto de secuencia del sym/sub-UA. Asimismo, cuando se empleó un molde de RNA con FU en el molde, 3D(V173I) presentó una selectividad 10 veces mayor para incorporar A en vez de G, lo que evitaría que se fijasen menos mutaciones una vez el FU ha sido incorporado en vez de U (Figura 2.16 y Tabla 5.2.3). Estos parámetros cinéticos concuerdan con la reducción de transiciones A→G y U→C causadas por FU como consecuencia de la presencia del cambio V173I en la polimerasa del virus. Por otro lado, cuando FUMP es incorporado frente a G se pueden producir transiciones G→A y C→U, siempre que el FU incorporado sea luego copiado como U. No se han apreciado diferencias entre ambas polimerasas al estudiar la incorporación de FU frente a G, pero 3D(V173I) presenta una eficiencia catalítica de incorporación de A frente a FU 10 veces mayor que 3Dwt, lo que ayudaría a fijar las mutaciones causadas por la incorporación de FU frente a G. Estos parámetros podrían ayudar a explicar el aumento en el número de transiciones G→A y C→U observado en el virus mutante pasado en presencia de FU.

Los parámetros cinéticos muestran que 3Dwt puede incorporar FU frente a A con una eficiencia catalítica similar a la de incorporación de U, que es 4 órdenes de magnitud mayor que la eficiencia de incorporación de FU frente a G (Tabla 5.2.3). Sin embargo, esta diferencia resulta ser mucho menor cuando determinamos la eficiencia catalítica de incorporación de A o G frente a FU, donde los cambios son de 3 órdenes de magnitud. Si esto es así, la discriminación de nucleótidos es mayor cuando FU tiene que ser incorporado en lugar de copiado, sugiriendo que la presencia de FU en el molde es un factor más determinante de la acción mutagénica de este compuesto que el comportamiento del análogo como sustrato.

6.2.3 La sustitución V173I es ventajosa en presencia de FU, pero supone un coste de eficacia biológica para el VFA

Pese a no haber observado diferencias significativas en los títulos virales de pMT28wt y pMT28-3D(V173I) pasados en presencia de FU, sí que se observó una mayor eficacia biológica del virus mutante al competir con pMT28wt en presencia FU. El aumento de eficacia biológica de pMT28-3D(V173I) se correlaciona además con la concentración de FU, lo que indica una ventaja selectiva de la sustitución V173I en presencia de FU. Las posibles razones por las cuales la sustitución V173I es favorable en presencia de FU se discuten a continuación.

Dada la doble acción inhibitoria y mutagénica del FU sobre el VFA, nos planteamos frente a cuál de los efectos que FU ejerce sobre replicación podría aportar la sustitución V173I una ventaja. Para estudiar el efecto de la sustitución V173I en la inhibición de uridilación de VPg por FUTP, se llevaron a cabo ensayos de uridilación de VPg en presencia de distintas concentraciones de FUTP. Los datos no mostraron diferencias entre 3Dwt y 3D(V173I) (Figura 5.2.12), sugiriendo que la resistencia del virus mutante a la acción inhibitoria de FUTP no se debe a falta de inhibición de la uridilación de VPg.

Al hilo de lo que ya ha sido expuesto en el apartado 6.2.2, el efecto mutagénico de FU tiene dos aspectos a tener en cuenta: por un lado aumenta la frecuencia de mutación del virus, y por el otro, aumenta la proporción de transiciones A→G y U→C. Si bien la frecuencia de mutación del virus mutante es menor que la del virus silvestre, ya sea en condiciones normales o tras el tratamiento con FU, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Aun así, los experimentos realizados en

presencia de GuH, en los que se pretendía estudiar la frecuencia de aparición de variantes resistentes a este compuesto, sugieren que el mutante tiende a generar un menor número de variantes, posiblemente debido a una menor tasa de mutación, que genera un espectro de mutantes menos complejo (Tabla 5.2.1). Los ensayos bioquímicos mostraron que 3D(V173I) presenta eficiencias de incorporación de nucleótidos incorrectos inferiores a las de 3Dwt (Tabla 5.2.3). Este aumento de la fidelidad de copia de la polimerasa podría explicar el descenso en la frecuencia de mutación de pMT28-3D(V173I) respecto a pMT28wt.

Es difícil discernir qué parámetros de los que están alterados por la presencia de la sustitución V173I en 3D son los que aportan la ventaja al virus para replicar en presencia de FU o si es el conjunto de las propiedades que confiere V173I a la polimerasa del virus la que hizo que esta sustitución fuese seleccionada en la población. De todos modos, el efecto de la sustitución V173I sobre el patrón de transiciones del virus pasado en presencia de FU es claro y viene apoyado por datos bioquímicos: el balance en los tipos de transiciones que presenta el virus mutante tratado con FU es parecido al esperable al pasar el VFA en condiciones normales y no está tan alterado como el del virus silvestre. No sabemos qué ventaja supone mantener el balance entre los tipos de transiciones. El efecto deletéreo de un cambio en el sesgo mutacional podría estar relacionado con el uso de codones, alteraciones en estructuras de RNA o incluso con el plegamiento de proteínas (Galtier & Lobry, 1997; Coleman *et al.*, 2008; Martrus *et al.*, 2013; Mendez *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2013). El mutante SSI pasado en presencia de R mantuvo el balance en el patrón de transiciones de tal forma que se redujo la frecuencia de aparición de mutaciones no sinónimas, así como la probabilidad de aparición de codones de parada (Agudo *et al.*, 2010). Al analizar los cambios de aminoácido que aparecen en las poblaciones de pMT28wt y pMT28-3D(V173I) pasadas en presencia de FU se observó que la frecuencia de aparición de mutaciones no sinónimas era incluso mayor para el virus mutante, siendo de 0,61 frente al 0,55 del virus silvestre (Tabla A.2 del Anexo) y no se encontraron diferencias en la distribución o potencial nocividad de tales mutaciones, estimada mediante el índice PAM250 de aceptabilidad de sustituciones (Figura 5.2.8, Tabla A.2 del Anexo). Aunque seguimos analizando las diferencias entre los espectros de mutantes producidos por el virus silvestre y mutante, en estos momentos no podemos aportar un modelo que explique la ventaja de la sustitución V173I al mantener un patrón equilibrado de transiciones.

Aunque hemos observado una ventaja adaptativa de V173I frente a la acción del fluorouracilo, la presencia de la sustitución supone un coste de eficacia biológica al

virus en ausencia del compuesto mutagénico (Figura 5.2.9). La posición 173 se encuentra en el motivo F de la polimerasa, implicada en la unión al molde y el reconocimiento de nucleótidos (Ferrer-Orta *et al.*, 2004). Pese a que algunos norovirus presentan isoleucina en el residuo equivalente a 173 (Ferrer-Orta *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2011; Ng *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2004), el VFA mantiene en esta posición (situada en una región estructural importante de la polimerasa) un residuo menos voluminoso, como es la valina. La presencia de isoleucina en la posición 173 provoca defectos de incorporación de nucleótidos, particularmente de purinas (Tabla 5.2.3), lo cual podría explicar parte de la pérdida de eficacia biológica causada por esta sustitución. Se han descrito pérdidas en eficacia biológica asociadas a un aumento de fidelidad de copia de virus (Coffey *et al.*, 2011; Levi *et al.*, 2010; Pfeiffer & Kirkegaard, 2005; Zeng *et al.*, 2014, revisado en Lloyd *et al.*, 2014), hasta el punto de proponer el uso de virus de fidelidad incrementada para el diseño de vacunas atenuadas (Vignuzzi *et al.*, 2008). Teniendo esto en cuenta, se esperaría que la menor tasa de mutación de pMT28-3D(V173I) tuviese un efecto negativo en la eficacia biológica del virus.

A nivel evolutivo, parece que la "evaluación" de costes/beneficios llevada a cabo por un proceso de selección natural hizo que, a pesar de los posibles efectos deletéreos de la sustitución V173I, esta se impusiese en la población tratada con FU.

6.3 Análisis funcional del extremo amino-terminal de 3D

6.3.1 Cambios en los residuos 18 y 20 de la polimerasa del VFA son deletéreos para el virus

La región de la polimerasa del VFA comprendida entre los residuos M16 y T24 fue identificada como una señal de localización nuclear (NLS) en el laboratorio del Dr. Sobrino (Sánchez-Aparicio *et al.*, 2013). A su vez se observó que los residuos M16, R17 y K18 aparecían reordenados en 3D(SSI) (Figura 5.3.1; Agudo *et al.*, 2010), como cambio conformacional destacable en esta polimerasa con las sustituciones P44S, P169S y M296I con baja sensibilidad a la acción mutagénica de R. En el laboratorio del Dr. Sobrino se construyeron clones infecciosos con las sustituciones K18E, K20E, K18A, K20A y K18A-K20A en la proteína 3D para estudiar la importancia de la secuencia de esta región en localización nuclear. De estos clones infecciosos, aquellos que contenían cambios a ácido glutámico revirtieron rápidamente al genotipo

silvestre. De los clones infecciosos con cambios a alanina, solo los virus con una única sustitución sobrevivieron, manteniendo la mutación estable durante 5 pases. A pesar de que los virus con K18A y K20A fueron viables, la producción viral fue menor que la del virus silvestre. Con estos experimentos quedó patente la importancia de la secuencia de aminoácidos de esta región para el VFA. Además, los datos bioquímicos refuerzan la idea de que cambios en la NLS de 3D tienen consecuencias deletéreas para la unión a RNA (Figuras 5.3.2-3) y para la actividad enzimática de 3D (Figuras 5.3.4-10).

6.3.2 Cambios en los residuos 18 y 20 de la polimerasa afectan la unión al RNA

Las polimerasas con las sustituciones K18E, K20E y, en menor medida, K18A, K20A y KAKA, mostraron una menor unión al RNA que la enzima silvestre. Los residuos R17 y R18, gracias a su carga positiva, interaccionan de forma directa con el RNA (Ferrer-Orta *et al.*, 2004), por lo que cabría esperar que cambios de carga introducidos en esta región afecten a la unión de la enzima con el RNA. No obstante, se han encontrado en las estructuras cristalográficas de 3D(K18E) y 3D(K20E) (resueltas por las Dras. Ferrer Orta y Verdaguer) reorganizaciones en la estructura de 3D que aportan información adicional acerca del defecto de unión a RNA de estas proteínas. En el caso de 3D(K18E) sin RNA se ha visto que el bucle $\beta 9$ - $\alpha 11$ de la polimerasa está movido hacia el centro activo de la enzima, dificultando la entrada del molde de RNA. Cuando 3D(K18E) se cristalizó en complejo con sym/sub-UA, se observó que el bucle $\beta 9$ - $\alpha 11$ se halla en una conformación abierta que permite el posicionamiento del RNA. En la estructura de 3D(K20E) sin RNA, en cambio, lo que se observó fue una conformación cerrada de toda la proteína, estabilizada por un puente de sal entre el residuo E20 y R416, que hace que el dominio *thumb* se aproxime al dominio *fingers*. Esta conformación tan cerrada requeriría reorganizaciones importantes para poder acomodar el RNA. En la estructura de 3D(K20A) con RNA se observó que se pierde la interacción de E20 con R416, permitiendo la apertura de la cavidad central de la polimerasa. Los datos estructurales encajan con los datos bioquímicos en los que se aprecia que, a pesar de no haber observado unión a RNA con estos mutantes, sí que pueden ejercer su acción de copiado de RNA. La afinidad de 3D por el RNA no tiene por qué afectar a las constantes de incorporación de nucleótidos, como demostraron los estudios realizados con la 3D de PV con defectos

de afinidad por el RNA causados también por cambios en el N-terminal (Hobdey *et al.*, 2010). Aun así, las polimerasas con cambios en los residuos 18 y 20 tienen afectada la tasa de incorporación de nucleótidos (Tabla 5.3.1).

6.3.3 Cambios en los residuos 18 y 20 de la polimerasa afectan al reconocimiento de nucleótidos

La proteína 3D con las sustituciones P44S, P169S y M296I, llamada 3D(SSI), presentó tasas de incorporación de R inferiores a 3Dwt, lo que permitió al virus con estas sustituciones resistir a la acción mutagénica de R (Agudo *et al.*, 2010). Dado que los cambios estructurales más significativos respecto a 3Dwt se concentraron en los residuos 16-18, se consideró interesante estudiar la incorporación de R de las polimerasas con los cambios en los residuos 18 y 20. Pese a que la k_{pol} de cada una de estas polimerasas en la incorporación de purinas es inferior a la de 3Dwt, la tasa de incorporación de R observada para los mutantes 3D(K18E), 3D(K20E) y, en menor medida, para 3D(K18A), 3D(K20A) y 3D(KAKA) es superior a la de la enzima silvestre. Estos datos parecen indicar que la NLS es también importante en el reconocimiento de nucleótidos y que alteraciones en esta zona pueden tener un efecto sobre fidelidad. Esto puede estar relacionado con el hecho de que los residuos M16 y R17 forman parte del canal por el cual el molde de RNA se posiciona en el centro activo y se ha observado que las cadenas laterales de estos residuos modulan la apertura de un bolsillo hidrofóbico formado por el motivo F y el motivo G para facilitar la entrada de nucleótidos. Para explorar esta posibilidad, se llevaron a cabo estudios con una polimerasa con un residuo menos voluminoso en la posición 16: la proteína 3D(M16A). Esperamos que datos estructurales que se están analizando actualmente revelen la naturaleza del comportamiento de las polimerasas con cambios en los residuos 18 y 20, y nos permitan saber por qué estos mutantes presentan mayores tasas de incorporación de R, a diferencia de lo que ocurre con 3D(SSI).

6.3.4 Reconocimiento de nucleótidos por 3D(M16A)

La proteína 3D(M16A) fue purificada tras la propuesta de la Dra. Nuria Verdaguer, que predijo un descenso en la fidelidad de copia como consecuencia de la eliminación de la cadena lateral de la metionina en la posición 16 de la polimerasa.

Esta proteína no presenta los defectos en unión a RNA que se observaron con las polimerasas con cambios en los residuos 18 y 20 y tampoco mostró defectos en síntesis de RNA. Los parámetros cinéticos de incorporación de nucleótidos calculados fueron similares a los de la enzima silvestre, salvo por un descenso en la k_{pol} de incorporación de purinas (Tabla 5.3.2). Cuando se analizó la incorporación de un nucleótido incorrecto en segunda posición (G frente a U) se observó que 3D(M16A) mostraba una tasa de incorporación de GMP tres veces mayor que 3Dwt, dando lugar a una menor selectividad de nucleótido incorrecto que 3Dwt. Este resultado sugiere que la sustitución M16A causa un descenso en la fidelidad de copia de 3D. 3D(M16A) también muestra un incremento en la incorporación de RMP respecto a 3Dwt (Figuras 5.3.22-25). Aunque las diferencias observadas no son tan grandes como las de los mutantes K18E y K20E, los resultados reiteran la tendencia de 3D(M16A) de incorporar nucleótidos incorrectos con una tasa mayor que 3Dwt. Los datos apoyan la hipótesis de que el residuo M16 sería un determinante de fidelidad, al estar enclavado entre el canal de RNA y el bolsillo hidrofóbico que acomoda el nucleótido entrante.

A diferencia de los virus con las sustituciones K18E y K20E, el clon infeccioso con la sustitución M16A presenta viabilidad en cultivos celulares y es genéticamente estable. Dado el papel que la fidelidad de copia parece tener sobre la adaptabilidad de los virus, la obtención de mutantes con fidelidad alterada supone una poderosa herramienta para el estudio de la teoría de cuasiespecies víricas, así como para entender las bases moleculares del reconocimiento de nucleótidos. PV con la sustitución de fidelidad G64S, al generar menor diversidad genómica, sufrió una pérdida de neurotropismo y patogénesis, solo restablecidas al expandir el espectro de mutantes mediante mutagénesis química (Vignuzzi *et al.*, 2006). Mutaciones que provocan incrementos en la frecuencia de mutación del virus de coxsackie B3 (CVB3) también causan atenuación y pérdidas de eficacia biológica (Gnädig *et al.*, 2012). Los estudios con mutantes de fidelidad incrementada (Coffey *et al.*, 2011; Levi *et al.*, 2010; Pfeiffer & Kirkegaard, 2005; Sadeghipour *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2008; Vignuzzi *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2014; revisado en Vignuzzi & Andino, 2010), así como de mutantes de fidelidad disminuida (Gnädig *et al.*, 2012), ponen de manifiesto el refinamiento en fidelidad de copia al que han sido sometidas las polimerasas víricas a lo largo de la evolución, para conseguir un equilibrio adecuado entre adaptabilidad y el mantenimiento de la información genética de forma estable.

Si el virus con la sustitución M16A realmente muestra una tasa de mutación mayor que la del virus silvestre, esta estaría aún más cerca del umbral de error. Esto implicaría que el virus M16A sería más susceptible que el virus wt a la mutagénesis

letal y que se debería extinguir antes que el virus silvestre al ser tratado con agentes mutagénicos. Experimentos considerando esta hipótesis están siendo llevados a cabo en nuestro laboratorio, ya que podrían apoyar la teoría de la catástrofe de error como base de la mutagénesis letal. La información molecular sobre las alteraciones de la polimerasa que promueven bajadas de fidelidad de copia podría contribuir al diseño de nuevos análogos de nucleótido que facilitaran mutagénesis y extinción de virus.

6.4 La proteína 2C del VFA podría ser una chaperona de ácidos nucleicos

Hasta la fecha no ha sido descrita ninguna proteína viral distinta de la polimerasa o de una proteína correctora de errores que tenga un papel en la fidelidad de copia del virus. Al pasar el VFA en presencia de altas dosis de R, se seleccionó la sustitución I248T en la proteína 2C. El clon infeccioso con I248T en 2C como única sustitución en su genoma mantuvo inalterado el balance en los tipos de transiciones a pesar de su replicación en presencia de R. En experimentos realizados *in vitro* con 2Cwt y 2C(I248T) se ha observado que las actividades ATPasa y GTPasa de 2Cwt, pero no de 2C(I248T), son inhibidas por la presencia de RTP. Además, la presencia de RNAs homopoliméricos afecta de modo distinto a las actividades ATPasa y GTPasa de 2C(I248T) y de 2Cwt (Agudo *et al.*, manuscrito en preparación), sugiriendo que la interacción de 2C con determinadas secuencias de RNA podría estar relacionada con la frecuencia de mutación del virus. El estudio de las bases moleculares de la compensación que la sustitución I248T confiere al VFA pasado en presencia de R se ve dificultado por los escasos datos que hay acerca del papel de 2C en replicación. Dada la putativa actividad helicasa de 2C, se llevaron a cabo experimentos de desestabilización de ácidos nucleicos con esta proteína.

Para llevar a cabo estudios bioquímicos con la proteína 2C, se aumentó su solubilidad mediante la delección de 33 aminoácidos del extremo N-terminal. La proteína con la delección [2C₍₃₄₋₃₁₈₎] es capaz de unir a RNA y de oligomerizar, aunque la actividad ATPasa se vio reducida respecto a la 2C completa fusionada a GST (Sweeney *et al.*, 2010). En nuestro laboratorio comprobamos que 2C₍₃₄₋₃₁₈₎ mantenía la capacidad de hidrolizar ATP (Figura 5.4.2), pero no se comprobó el impacto que la delección tuvo sobre esta actividad, ya que tampoco teníamos la proteína completa en

solución estable. Tampoco podemos asegurar que la delección de 33 residuos haya afectado los resultados obtenidos y que comentamos a continuación.

Una actividad remodeladora del RNA es importante para virus RNA, ya que el RNA genómico del virus puede plegarse de distintas formas, pudiendo dar lugar a estructuras intermedias inactivas (Musier-Forsyth, 2010; Woodson, 2010a). Para evitar dichos plegamientos, células y virus se arman de proteínas capaces de modelar la estructura terciaria del RNA (Zúñiga *et al.*, 2009). Dichas proteínas se pueden clasificar en 3 tipos (Rajkowitsch *et al.*, 2007): 1) helicasas de RNA, que usan su actividad ATPasa para desaparecer pares de bases; 2) chaperonas de RNA (frecuentemente llamadas chaperonas de ácidos nucleicos por su carácter promiscuo frente RNA o DNA), que desestabilizan la hélice de RNA sin necesidad de ATP para promover la formación de estructuras de RNA globalmente más estables, y 3) hibridadores de RNA, que aceleran la unión de 2 hebras complementarias de RNA sin necesidad de ATP. Los ensayos de actividad helicasa descritos en la presente tesis demuestran la capacidad de la proteína $2C_{(34-318)}$ de desestabilizar la doble hélice del DNA de forma independiente de ATP, siempre y cuando el ácido nucleico tenga un extremo prominente en 5'. La 2C de EoV también mostró una predilección por extremos prominentes en 5', aunque en este caso también se observó separación de hebra a partir de un extremo en 3' (Cheng *et al.*, 2013). La 2C de EoV, tal y como hemos observado en $2C_{(34-318)}$, lleva a cabo la desestabilización de ácidos nucleicos independientemente de hidrólisis de ATP. Además de la desestabilización de la doble banda, la 2C de EoV presentó una propiedad antagónica: la de hibridación de hebras de RNA (Cheng *et al.*, 2013). Los autores del trabajo proponen que, dado su carácter remodelador del RNA, tanto separando como hibridando hebras de RNA de forma independiente de ATP, la proteína 2C de EoV podría incluirse dentro de la categoría de chaperonas de RNA. Esta función ya había sido propuesta para la proteína 2C de PV, que podría estar mediando la formación de complejos de ribonucleoproteína (RNP) con elementos reguladores de RNA (Steil & Barton, 2009). La función principal de las chaperonas de RNA es evitar el plegamiento incorrecto del RNA, que suele dar lugar a estructuras estables con energía global baja, y facilitar la formación de estructuras con alta energía global, que son termodinámicamente más estables, pero se forman más lentamente (Woodson, 2010b). El genoma de picornavirus contiene numerosos elementos estructurados de RNA (RNA cre, IRES, fragmento S, hoja de trébol en 3', etc.) que podrían requerir de la acción de una chaperona para su correcta formación. No se han realizado ensayos con $2C_{(34-318)}$ del VFA que permitan ver hibridación de RNA, pero las similitudes bioquímicas y filogenéticas de las proteínas

2C del VFA y de EoV sugieren que la función de ambas proteínas podría ser parecida. Experimentos adicionales con la proteína 2C del VFA son necesarios para determinar si estimula la hibridación de RNA.

La idea de que la actividad ATPasa de 2C podría impulsar la separación de hebras con la energía del enlace fosfodiéster del ATP era atractiva. Sin embargo, dicha actividad no explica esta propiedad de 2C y la función de la actividad ATPasa en la proteína 2C del VFA sigue siendo desconocida. El ATP no solo es prescindible para la actividad helicasa de 2C₍₃₄₋₃₁₈₎, sino que a altas concentraciones inhibe la desestabilización de la doble banda de DNA (Figura 5.4.7). La inhibición de la actividad helicasa por altas concentraciones de ATP ha sido ya descrita para la helicasa del virus del Nilo occidental, que es dependiente de ATP (Borowski *et al.*, 2001). Podemos especular acerca de un posible papel del ATP en la actividad observada en 2C. La actividad remodeladora de la proteína NS3 del virus del dengue (DENV), basada en un balance entre la actividad separadora e hibridadora de RNA, puede ser modulada por la disponibilidad de ATP (Gebhard *et al.*, 2012). Además, la presencia de poli(U) (presente en intermediarios replicativos tanto de picornavirus como de flavivirus) estimula la actividad ATPasa de NS3 de HCV y de DENV, a la vez que inhibe la actividad helicasa de esta proteína (Junaid *et al.*, 2013; Morgenstern *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2009). No hemos estudiado el efecto de poli(U) sobre la actividad helicasa de 2C₍₃₄₋₃₁₈₎, pero sabemos que poli(U) y poli(A) son capaces de estimular la actividad ATPasa y GTPasa de 2C (Agudo *et al.*, manuscrito en preparación). Estas analogías y la similitud en el ciclo infeccioso de picornavirus y flavivirus invitan a pensar que podría haber una regulación de la actividad de 2C del VFA basada en disponibilidad de ATP.

Las enzimas remodeladoras de ácidos nucleicos son promiscuas, actuando tanto sobre RNA como sobre DNA. Se llevó a cabo el estudio con DNA por las ventajas técnicas y económicas que su uso conlleva. De todos modos, no se obtuvieron resultados satisfactorios con RNA. Si tenemos en cuenta que la proteína 2C es potencialmente un hibridador de hebras de RNA, no es de extrañar que la actividad helicasa de esta proteína haya sido eclipsada por una actividad antagónica que revierte el efecto de la actividad que se desea demostrar. El RNA tiene cualidades termodinámicas distintas al DNA (Lesnik & Freier, 1995), siendo el dúplex de RNA más estable que el de DNA. Es posible que no hayamos empleado un dúplex de RNA adecuado ni las condiciones necesarias para que la separación de hebras tenga lugar. Quizás sea por esta razón que la actividad helicasa de 2C de picornavirus no ha sido aún descrita en la literatura científica.

7 Conclusiones

1.- La sustitución G62S en 3D disminuye la eficacia biológica del virus de la fiebre aftosa (VFA), por lo que esta sustitución no se selecciona al replicar el virus en presencia de ribavirina (R). Las sustituciones G62S y M296I en la 3D del VFA, juntas o por separado, provocan una menor incorporación de ribavirina-5'-monofosfato (RMP), dando lugar a una menor sensibilidad a R en pMT28-3D(G62S), pMT28-3D(M296I) y pMT28-3D(G62S-M296I). Las estructuras cristalográficas de 3D sugieren que las sustituciones G62S y M296I afectan al reconocimiento de nucleótidos.

2.- La sustitución V173I en 3D confiere al VFA un aumento de eficacia biológica en presencia de 5-fluorouracilo (FU), pero no en su ausencia. La sustitución evita el exceso de mutaciones $A \rightarrow G$ y $U \rightarrow C$ promovido por el FU. Parámetros cinéticos de incorporación de nucleótidos con FUTP como sustrato o FU en el molde por 3D explican el balance de transiciones observado en los espectros de mutantes.

3.- Con la 3D del VFA, el 5-fluorouracilo tiene más potencial para generar errores de copia una vez que ha sido incorporado en el RNA y ha de ser reconocido como molde que como sustrato nucleotídico a incorporar frente a las purinas estándar.

4.- Sustituciones en los residuos 18 y 20 de 3D provocan defectos de unión a RNA y de actividad enzimática, además de un incremento en la incorporación de RMP. 3D con la sustitución M16A presenta una mayor tasa de incorporación de RMP y de nucleótidos incorrectos que 3D $_{wt}$. La región del dominio *fingertips* comprendida entre los residuos 16 y 24 estaría, por tanto, implicada en unión al RNA, localización nuclear y reconocimiento de nucleótidos.

5.- La proteína 2C₍₃₄₋₃₁₈₎ estimula el desenrollamiento de DNA de doble banda de forma independiente de ATP y dependiente de un extremo prominente del molde en 5'.

8 Bibliografía

- A**charya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D. & Brown, F. (1989). The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* 337, 709-716.
- Adams, P., Kandiah, E., Effantin, G., Steven, A. C. & Ehrenfeld, E. (2009). Poliovirus 2C protein forms homo-oligomeric structures required for ATPase activity. *J Biol Chem* 284, 22012-22021.
- Adedeji, A. O., Marchand, B., Te Velhuis, A. J., Snijder, E. J., Weiss, S., Eoff, R. L., Singh, K. & Sarafianos, S. G. (2012). Mechanism of nucleic acid unwinding by SARS-CoV helicase. *PLoS One* 7, e36521.
- Agol, V. I. (2006). Molecular mechanisms of poliovirus variation and evolution. *Curr Top Microbiol Immunol* 299, 211-259.
- Agol, V. I. (2010). Picornaviruses as a model for studying the nature of RNA recombination. In *The Picornaviruses*, pp. 239-252. Edited by E. Ehrenfeld, E. Domingo & R. P. Roos: ASM Press, Washington, DC.
- Agudo, R., Arias, A. & Domingo, E. (2009). 5-fluorouracil in lethal mutagenesis of foot-and-mouth disease virus. *Future Med Chem* 1, 529-539.
- Agudo, R., Arias, A., Pariente, N., Perales, C., Escarmis, C., Jorge, A., Marina, A. & Domingo, E. (2008). Molecular characterization of a dual inhibitory and mutagenic activity of 5-fluorouridine triphosphate on viral RNA synthesis. Implications for lethal mutagenesis. *J Mol Biol* 382, 652-666.
- Agudo, R., Ferrer-Orta, C., Arias, A., de la Higuera, I., Perales, C., Perez-Luque, R., Verdaguer, N. & Domingo, E. (2010). A multi-step process of viral adaptation to a mutagenic nucleoside analogue by modulation of transition types leads to extinction-escape. *PLoS Pathog* 6, e1001072.
- Airaksinen, A., Pariente, N., Menendez-Arias, L. & Domingo, E. (2003). Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology* 311, 339-349.
- Arias, A., Agudo, R., Ferrer-Orta, C., Perez-Luque, R., Airaksinen, A., Brocchi, E., Domingo, E., Verdaguer, N. & Escarmis, C. (2005). Mutant viral polymerase in the transition of virus to error catastrophe identifies a critical site for RNA binding. *J Mol Biol* 353, 1021-1032.
- Arias, A., Arnold, J. J., Sierra, M., Smidansky, E. D., Domingo, E. & Cameron, C. E. (2008). Determinants of RNA-dependent RNA polymerase (in)fidelity revealed by kinetic analysis of the polymerase encoded by a foot-and-mouth disease virus mutant with reduced sensitivity to ribavirin. *J Virol* 82, 12346-12355.
- Arias, A., Isabel de Avila, A., Sanz-Ramos, M., Agudo, R., Escarmis, C. & Domingo, E. (2013). Molecular dissection of a viral quasispecies under mutagenic treatment: positive correlation between fitness loss and mutational load. *J Gen Virol* 94, 817-830.
- Arnold, J. J. & Cameron, C. E. (2000). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D^{pol}). Assembly of stable, elongation-competent complexes by using a symmetrical primer-template substrate (sym/sub). *J Biol Chem* 275, 5329-5336.

- Arnold, J. J., Ghosh, S. K. & Cameron, C. E. (1999). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D(pol)). Divalent cation modulation of primer, template, and nucleotide selection. *J Biol Chem* 274, 37060-37069.
- Arribas, M., Cabanillas, L. & Lazaro, E. (2011). Identification of mutations conferring 5-azacytidine resistance in bacteriophage Qbeta. *Virology* 417, 343-352.
- B**altera, R. F., Jr. & Tershak, D. R. (1989). Guanidine-resistant mutants of poliovirus have distinct mutations in peptide 2C. *J Virol* 63, 4441-4444.
- Balzarini, J., Karlsson, A., Wang, L., Bohman, C., Horska, K., Votruba, I., Fridland, A., Van Aerschot, A., Herdewijn, P. & De Clercq, E. (1993). Eicar (5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide). A novel potent inhibitor of inosinate dehydrogenase activity and guanylate biosynthesis. *J Biol Chem* 268, 24591-24598.
- Banerjee, R. & Dasgupta, A. (2001). Interaction of picornavirus 2C polypeptide with the viral negative-strand RNA. *J Gen Virol* 82, 2621-2627.
- Banerjee, R., Weidman, M. K., Echeverri, A., Kundu, P. & Dasgupta, A. (2004). Regulation of poliovirus 3C protease by the 2C polypeptide. *J Virol* 78, 9243-9256.
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Pariente, N., Verdaguer, N. & Domingo, E. (2003). Evolution of cell recognition by viruses: a source of biological novelty with medical implications. *Adv Virus Res* 62, 19-111.
- Baranowski, E., Sevilla, N., Verdaguer, N., Ruíz-Jarabo, C. M., Beck, E. & Domingo, E. (1998). Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* 72, 6362-6372.
- Barnes, W. M. (1994). PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 2216-2220.
- Barton, D. J. & Flanagan, J. B. (1997). Synchronous replication of poliovirus RNA: initiation of negative-strand RNA synthesis requires the guanidine-inhibited activity of protein 2C. *J Virol* 71, 8482-8489.
- Batschelet, E., Domingo, E. & Weissmann, C. (1976). The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene* 1, 27-32.
- Bausch, D. G., Hadi, C. M., Khan, S. H. & Lertora, J. J. (2010). Review of the literature and proposed guidelines for the use of oral ribavirin as postexposure prophylaxis for Lassa fever. *Clin Infect Dis* 51, 1435-1441.
- Begue, J. P. & Bonnet-Delpon, D. (2008). *Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine*. New Jersey: J. Willey & Sons Inc.
- Belsham, G. J. & Normann, P. (2008). Dynamics of picornavirus RNA replication within infected cells. *J Gen Virol* 89, 485-493.
- Benarroch, D., Egloff, M. P., Mulard, L., Guerreiro, C., Romette, J. L. & Canard, B. (2004). A structural basis for the inhibition of the NS5 dengue virus mRNA 2'-O-methyltransferase domain by ribavirin 5'-triphosphate. *J Biol Chem* 279, 35638-35643.
- Biebricher, C. K. & Domingo, E. (2007). The advantage of the high genetic diversity in RNA viruses. *Future Virology* 2, 35-38.
- Biebricher, C. K. & Eigen, M. (2006). What is a quasispecies? *Current Topics in Microbiol and Immunol* 299, 1-31.
- Bienz, K., Egger, D., Troxler, M. & Pasamontes, L. (1990). Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J Virol* 64, 1156-1163.
- Borowski, P., Niebuhr, A., Mueller, O., Bretner, M., Felczak, K., Kulikowski, T. & Schmitz, H. (2001). Purification and characterization of West Nile virus nucleoside triphosphatase (NTPase)/helicase: evidence for dissociation of the NTPase and helicase activities of the

- enzyme. *J Virol* 75, 3220-3229.
- Bougie, I. & Bisaillon, M. (2004). The broad spectrum antiviral nucleoside ribavirin as a substrate for a viral RNA capping enzyme. *J Biol Chem* 279, 22124-22130.
- Bouvet, M., Imbert, I., Subissi, L., Gluais, L., Canard, B. & Decroly, E. (2012). RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 9372-9377.
- Brown, C. C. (2004). Stepping stones in foot-and-mouth disease research: a personal view. In *Foot-and-Mouth Disease: current perspectives*, pp. 1-18. Edited by F. Sobrino & E. Domingo. Wymondhan, England: Horizon Bioscience.
- Bruenn, J. A. (2003). A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 31, 1821-1829.
- C**arrico, C. K. & Glazer, R. I. (1979). Effect of 5-fluorouracil on the synthesis and translation of polyadenylic acid-containing RNA from regenerating rat liver. *Cancer Res* 39, 3694-3701.
- Cassidy, L. F. & Patterson, J. L. (1989). Mechanism of La Crosse virus inhibition by ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother* 33, 2009-2011.
- Castro, C., Arnold, J. J. & Cameron, C. E. (2005). Incorporation fidelity of the viral RNA-dependent RNA polymerase: a kinetic, thermodynamic and structural perspective. *Virus Res* 107, 141-149.
- Castro, C., Smidansky, E. D., Arnold, J. J., Maksimchuk, K. R., Moustafa, I., Uchida, A., Gotte, M., Konigsberg, W. & Cameron, C. E. (2009). Nucleic acid polymerases use a general acid for nucleotidyl transfer. *Nat Struct Mol Biol* 16, 212-218.
- Charpentier, N., Davila, M., Domingo, E. & Escarmis, C. (1996). Long-term, large-population passage of aphthovirus can generate and amplify defective noninterfering particles deleted in the leader protease gene. *Virology* 223, 10-18.
- Chen, S. & Wang, Y. (2002). [Genetic variation characteristics of the envelope region of hepatitis C virus in the patients with chronic hepatitis]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 16, 219-222.
- Cheng, Z., Yang, J., Xia, H., Qiu, Y., Wang, Z., Han, Y., Xia, X., Qin, C. F., Hu, Y. & Zhou, X. (2013). The nonstructural protein 2C of a Picorna-like virus displays nucleic acid helix destabilizing activity that can be functionally separated from its ATPase activity. *J Virol* 87, 5205-5218.
- Coleman, J. R., Papamichail, D., Skiena, S., Fitcher, B., Wimmer, E. & Mueller, S. (2008). Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias. *Science* 320, 1784-1787.
- Coffey, L. L., Beeharry, Y., Borderia, A. V., Blanc, H. & Vignuzzi, M. (2011). Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16038-16043.
- Cooper, A. C., Banasiak, N. C. & Allen, P. J. (2003). Management and prevention strategies for respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in infants and young children: a review of evidence-based practice interventions. *Pediatr Nurs* 29, 452-456.
- Crotty, S., Cameron, C. E. & Andino, R. (2001). RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6895-6900.
- Crotty, S., Maag, D., Arnold, J. J., Zhong, W., Lau, J. Y. N., Hong, Z., Andino, R. & Cameron, C. E. (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleotide, ribavirin, is an RNA virus mutagen. *Nature Medicine* 6, 1375-1379.
- Cummings, K. J., Lee, S. M., West, E. S., Cid-Ruzafa, J., Fein, S. G., Aoki, Y., Sulkowski, M. S. & Goodman, S. N. (2001). Interferon and ribavirin vs interferon alone in the re-treatment of chronic hepatitis C previously nonresponsive to interferon: A meta-analysis of

randomized trials. *Jama* 285, 193-199.

- D**avis, G. L., Esteban-Mur, R., Rustgi, V., Hoefs, J., Gordon, S. C., Trepo, C., Shiffman, M. L., Zeuzem, S., Craxi, A., Ling, M. H. & Albrecht, J. (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339, 1493-1499.
- Day, C. W., Smee, D. F., Julander, J. G., Yamshchikov, V. F., Sidwell, R. W. & Morrey, J. D. (2005). Error-prone replication of West Nile virus caused by ribavirin. *Antiviral Res* 67, 38-45.
- de la Torre, J. C., Martínez-Salas, E., Diez, J., Villaverde, A., Gebauer, F., Rocha, E., Dávila, M. & Domingo, E. (1988). Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* 62, 2050-2058.
- de la Torre, J. C., Wimmer, E. & Holland, J. J. (1990). Very high frequency of reversion to guanidine resistance in clonal pools of guanidine-dependent type 1 poliovirus. *J Virol* 64, 664-671.
- De Palma, A. M., Heggermont, W., Lanke, K., Coutard, B., Bergmann, M., Monforte, A. M., Canard, B., De Clercq, E., Chimirri, A., Purstinger, G., Rohayem, J., van Kuppeveld, F. & Neyts, J. (2008). The thiazolobenzimidazole TBZE-029 inhibits enterovirus replication by targeting a short region immediately downstream from motif C in the nonstructural protein 2C. *J Virol* 82, 4720-4730.
- Denison, M. R., Graham, R. L., Donaldson, E. F., Eckerle, L. D. & Baric, R. S. (2011). Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biol* 8, 270-279.
- Dolnick, B. J. & Wu, X. P. (1993). Effects of 5-fluorouracil on mRNA. *Adv Exp Med Biol* 339, 57-63; discussion 65.
- Domingo, E. (2007). Virus Evolution. In: *Fields Virology*, 5th edn, pp. 389-421. Edited by D.M. Knipe, P.M. Howley & eds. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia.
- Domingo, E., Davila, M. & Ortin, J. (1980). Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* 11, 333-346.
- Domingo, E., Sabo, D., Taniguchi, T. & Weissmann, C. (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* 13, 735-744.
- Domingo, E., Sheldon, J. & Perales, C. (2012). Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 159-216.
- Domingo-Calap, P., Pereira-Gomez, M. & Sanjuan, R. (2012). Nucleoside analogue mutagenesis of a single-stranded DNA virus: evolution and resistance. *J Virol* 86, 9640-9646.
- Doong, S. L. & Dolnick, B. J. (1988). 5-Fluorouracil substitution alters pre-mRNA splicing in vitro. *J Biol Chem* 263, 4467-4473.
- Dragun, M., Rada, B., Novotny, L. & Beranek, J. (1990). Antiviral activities of pyrimidine nucleoside analogues: some structure--activity relationships. *Acta Virol* 34, 321-329.
- Drake, J. W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7160-7164.
- Drake, J. W. & Holland, J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 13910-13913.
- Duarte, E., Clarke, D., Moya, A., Domingo, E. & Holland, J. (1992). Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6015-6019.
- Dulbecco, R. & Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8, 396-397.

- E**cheverri, A., Banerjee, R. & Dasgupta, A. (1998). Amino-terminal region of poliovirus 2C protein is sufficient for membrane binding. *Virus Res* 54, 217-223.
- Echeverri, A. C. & Dasgupta, A. (1995). Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* 208, 540-553.
- Eigen, M. (1971). Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* 58, 465-523.
- Eigen, M. (1993). Viral quasispecies. *Sci Am* 269, 42-49.
- Eigen, M. (2002). Error catastrophe and antiviral strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 13374-13376.
- Eigen, M. & Biebricher, C. K. (1988). Sequence space and quasispecies distribution. In *RNA Genetics*, pp. 211-245. Edited by E. Domingo, P. Ahlquist & J. J. Holland. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Eigen, M. & Schuster, P. (1979). *The hypercycle. A principle of natural self-organization*. Berlin: Springer.
- Escarmís, C., Dávila, M. & Domingo, E. (1999). Multiple molecular pathways for fitness recovery of an RNA virus debilitated by operation of Muller's ratchet. *J Mol Biol* 285, 495-505.
- F**eng, D. F. & Doolittle, R. F. (1996). Progressive alignment of amino acid sequences and construction of phylogenetic trees from them. *Methods in Enzymol* 266, 368-382.
- Fernandez-Larsson, R. & Patterson, J. L. (1990). Ribavirin is an inhibitor of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Mol Pharmacol* 38, 766-770.
- Ferrer-Orta, C., Agudo, R., Domingo, E. & Verdaguer, N. (2009). Structural insights into replication initiation and elongation processes by the FMDV RNA-dependent RNA polymerase. *Curr Opin Struct Biol* 19, 752-758.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Agudo, R., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E. & Verdaguer, N. (2006a). The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J* 25, 880-888.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Escarmis, C. & Verdaguer, N. (2006b). A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* 16, 27-34.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E. & Verdaguer, N. (2004). Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J Biol Chem* 279, 47212-47221.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E. & Verdaguer, N. (2007). Sequential structures provide insights into the fidelity of RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9463-9468.
- Ferrer-Orta, C., Sierra, M., Agudo, R., de la Higuera, I., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E. & Verdaguer, N. (2010). Structure of foot-and-mouth disease virus mutant polymerases with reduced sensitivity to ribavirin. *J Virol* 84, 6188-6199.
- Fox, E. J. & Loeb, L. A. (2010). Lethal mutagenesis: targeting the mutator phenotype in cancer. *Semin Cancer Biol* 20, 353-359.
- Freistadt, M. S., Meades, G. D. & Cameron, C. E. (2004). Lethal mutagens: broad-spectrum antivirals with limited potential for development of resistance? *Drug Resist Updat* 7, 19-24.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A. & Ellenberger, T. (2006). *DNA repair and mutagenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology.

- Gago, S., Elena, S. F., Flores, R. & Sanjuan, R. (2009). Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid. *Science* 323, 1308.
- Gallei, A., Pankraz, A., Thiel, H. J. & Becher, P. (2004). RNA recombination in vivo in the absence of viral replication. *J Virol* 78, 6271-6281.
- Gallois-Montbrun, S., Chen, Y., Dutartre, H., Sophys, M., Morera, S., Guerreiro, C., Schneider, B., Mulard, L., Janin, J., Veron, M., Deville-Bonne, D. & Canard, B. (2003). Structural analysis of the activation of ribavirin analogs by NDP kinase: comparison with other ribavirin targets. *Mol Pharmacol* 63, 538-546.
- Galtier, N. & Lobry, J. R. (1997). Relationships between genomic G+C content, RNA secondary structures, and optimal growth temperature in prokaryotes. *J Mol Evol* 44, 632-636.
- García-Arriaza, J., Manrubia, S. C., Toja, M., Domingo, E. & Escarmís, C. (2004). Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *J Virol* 78, 11678-11685.
- Ge, L., Zhang, J., Zhou, X. & Li, H. (2007). Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl china virus. *J Virol* 81, 5902-5907.
- Gebhard, L. G., Kaufman, S. B. & Gamarnik, A. V. (2012). Novel ATP-independent RNA annealing activity of the dengue virus NS3 helicase. *PLoS One* 7, e36244.
- Ghoshal, K. & Jacob, S. T. (1997). An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug. *Biochem Pharmacol* 53, 1569-1575.
- Gladue, D. P., O'Donnell, V., Baker-Branstetter, R., Holinka, L. G., Pacheco, J. M., Fernandez-Sainz, I., Lu, Z., Brocchi, E., Baxt, B., Piccone, M. E., Rodriguez, L. & Borca, M. V. (2012). Foot-and-mouth disease virus nonstructural protein 2C interacts with Beclin1, modulating virus replication. *J Virol* 86, 12080-12090.
- Gnädig, N. F., Beaucourt, S., Campagnola, G., Borderia, A. V., Sanz-Ramos, M., Gong, P., Blanc, H., Peersen, O. B. & Vignuzzi, M. (2012). Coxsackievirus B3 mutator strains are attenuated in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E2294-2303.
- González-López, C., Gómez-Mariano, G., Escarmís, C. & Domingo, E. (2005). Invariant aphthovirus consensus nucleotide sequence in the transition to error catastrophe. *Infection Genetics and Evolution* 5, 366-374.
- Gorbalenya, A. E. & Koonin, E. V. (1988). One more conserved sequence motif in helicases. *Nucleic Acids Res* 16, 7734.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P. & Blinov, V. M. (1988). A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Lett* 235, 16-24.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V. & Wolf, Y. I. (1990). A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses. *FEBS Lett* 262, 145-148.
- Gorbalenya, A. E. & Lauber, C. (2010). Origin and evolution of the Picornaviridae proteome. In *The Picornaviruses*, pp. 253-270. Edited by E. Ehrenfeld, E. Domingo & R. P. Roos: ASM Press, Washington, DC.
- Gorbalenya, A. E., Pringle, F. M., Zeddam, J. L., Luke, B. T., Cameron, C. E., Kalkmakoff, J., Hanzlik, T. N., Gordon, K. H. & Ward, V. K. (2002). The palm subdomain-based active site is internally permuted in viral RNA-dependent RNA polymerases of an ancient lineage. *J Mol Biol* 324, 47-62.
- Gordon, M. P. & Staehelin, M. (1959). Studies on the incorporation of 5-fluorouracil into a virus nucleic acid. *Biochim Biophys Acta* 36, 351-361.
- Goswami, B. B., Borek, E., Sharma, O. K., Fujitaki, J. & Smith, R. A. (1979). The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA. *Biochem Biophys Res*

- Commun* 89, 830-836.
- Graci, J. D. & Cameron, C. E. (2006). Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev Med Virol* 16, 37-48.
- Grande-Pérez, A., Gómez-Mariano, G., Lowenstein, P. R. & Domingo, E. (2005a). Mutagenesis-induced, large fitness variations with an invariant arenavirus consensus genomic nucleotide sequence. *J Virol* 79, 10451-10459.
- Grande-Pérez, A., Lazaro, E., Lowenstein, P., Domingo, E. & Manrubia, S. C. (2005b). Suppression of viral infectivity through lethal defection. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 4448-4452.
- Grande-Pérez, A., Sierra, S., Castro, M. G., Domingo, E. & Lowenstein, P. R. (2002). Molecular indetermination in the transition to error catastrophe: systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with large increases in mutant spectrum complexity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 12938-12943.
- Greenbaum, B. D., Li, O. T., Poon, L. L., Levine, A. J. & Rabadan, R. (2012). Viral reassortment as an information exchange between viral segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 3341-3346.
- Gregori, J., Salicru, M., Domingo, E., Sanchez, A., Esteban, J. I., Rodriguez-Frias, F. & Quer, J. (2014). Inference with viral quasispecies diversity indices: clonal and NGS approaches. *Bioinformatics*, en prensa.
- H**adaschik, D., Klein, M., Zimmermann, H., Eggers, H. J. & Nelsen-Salz, B. (1999). Dependence of echovirus 9 on the enterovirus RNA replication inhibitor 2-(alpha-Hydroxybenzyl)-benzimidazole maps to nonstructural protein 2C. *J Virol* 73, 10536-10539.
- Hansen, J., Long, A. M. & Schultz, S. (1997). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* 15, 1109-1122.
- Harris, D., Kaushik, N., Pandey, P. K., Yadav, P. N. & Pandey, V. N. (1998). Functional analysis of amino acid residues constituting the dNTP binding pocket of HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* 273, 33624-33634.
- Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R. J., Plevin, E. & Scheiner, J. (1957). Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 179, 663-666.
- Hobdey, S. E., Kempf, B. J., Steil, B. P., Barton, D. J. & Peersen, O. B. (2010). Poliovirus polymerase residue 5 plays a critical role in elongation complex stability. *J Virol* 84, 8072-8084.
- Holland, J. J., de la Torre, J. C., Clarke, D. K. & Duarte, E. (1991). Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J Virol* 65, 2960-2967.
- Holland, J. J., Domingo, E., de la Torre, J. C. & Steinhauer, D. A. (1990). Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J Virol* 64, 3960-3962.
- Holland, J. J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S. & VandePol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215, 1577-1585.
- Hopkins, R. L. & Goodman, M. F. (1980). Deoxyribonucleotide pools, base pairing, and sequence configuration affecting bromodeoxyuridine- and 2-aminopurine-induced mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1801-1805.
- Hultgren, C., Milich, D. R., Weiland, O. & Sallberg, M. (1998). The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol* 79 (Pt 10), 2381-2391.

- J**in, Z., Leveque, V., Ma, H., Johnson, K. A. & Klumpp, K. (2013). NTP-mediated nucleotide excision activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E348-357.
- Joensuu, H. & Gligorov, J. (2012). Adjuvant treatments for triple-negative breast cancers. *Ann Oncol* 23 Suppl 6, vi40-45.
- Junaid, M., Angsuthanasombat, C., Wikberg, J. E., Ali, N. & Katzenmeier, G. (2013). Modulation of enzymatic activity of dengue virus nonstructural protein NS3 nucleoside triphosphatase/helicase by poly(u). *Biochemistry (Mosc)* 78, 925-932.
- K**anamaru, R., Kakuta, H., Sato, T., Ishioka, C. & Wakui, A. (1986). The inhibitory effects of 5-fluorouracil on the metabolism of preribosomal and ribosomal RNA in L-1210 cells in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol* 17, 43-46.
- Kim, B., Ayran, J. C., Sagar, S. G., Adman, E. T., Fuller, S. M., Tran, N. H. & Horrigan, J. (1999). New human immunodeficiency virus, type 1 reverse transcriptase (HIV-1 RT) mutants with increased fidelity of DNA synthesis. Accuracy, template binding, and processivity. *J Biol Chem* 274, 27666-27673.
- Kim, T. W., Briebe, L. G., Ellenberger, T. & Kool, E. T. (2006). Functional evidence for a small and rigid active site in a high fidelity DNA polymerase: probing T7 DNA polymerase with variably sized base pairs. *J Biol Chem* 281, 2289-2295.
- Kirkegaard, K. & Semler, B. L. (2010). Genome replication II: the process. In *The Picornaviruses*, pp. 127-140. Edited by E. Ehrenfeld, E. Domingo & R. P. Ross. Washington D.C.: ASM Press.
- Klein, M., Eggers, H. J. & Nelsen-Salz, B. (1999). Echovirus 9 strain barty non-structural protein 2C has NTPase activity. *Virus Res* 65, 155-160.
- Klein, M., Hadaschik, D., Zimmermann, H., Eggers, H. J. & Nelsen-Salz, B. (2000). The picornavirus replication inhibitors HBB and guanidine in the echovirus-9 system: the significance of viral protein 2C. *J Gen Virol* 81, 895-901.
- Knowles, N. J., Samuel, A. R., Davies, P. L., Kitching, R. P. & Donaldson, A. I. (2001). Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in the UK caused by a pandemic strain. *Veterinary Record* 148, 258-259.
- L**anford, R. E., Chavez, D., Guerra, B., Lau, J. Y., Hong, Z., Brasky, K. M. & Beames, B. (2001). Ribavirin induces error-prone replication of GB virus B in primary tamarin hepatocytes. *J Virol* 75, 8074-8081.
- Lee, J. H., Alam, I., Han, K. R., Cho, S., Shin, S., Kang, S., Yang, J. M. & Kim, K. H. (2011). Crystal structures of murine norovirus-1 RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* 92, 1607-1616.
- Lenz, H. J., Manno, D. J., Danenberg, K. D. & Danenberg, P. V. (1994). Incorporation of 5-fluorouracil into U2 and U6 snRNA inhibits mRNA precursor splicing. *J Biol Chem* 269, 31962-31968.
- Lescar, J. & Canard, B. (2009). RNA-dependent RNA polymerases from flaviviruses and Picornaviridae. *Curr Opin Struct Biol* 19, 759-767.
- Lesnik, E. A. & Freier, S. M. (1995). Relative thermodynamic stability of DNA, RNA, and DNA:RNA hybrid duplexes: relationship with base composition and structure. *Biochemistry* 34, 10807-10815.
- Levi, L. I., Gnadig, N. F., Beaucourt, S., McPherson, M. J., Baron, B., Arnold, J. J. & Vignuzzi, M. (2010). Fidelity variants of RNA dependent RNA polymerases uncover an indirect, mutagenic activity of amiloride compounds. *PLoS Pathog* 6, e1001163.
- Li, J. P. & Baltimore, D. (1990). An intragenic revertant of a poliovirus 2C mutant has an

- uncoating defect. *J Virol* 64, 1102-1107.
- Lloyd, S. B., Kent, S. J. & Winnall, W. R. (2014). The high cost of fidelity. *AIDS Res Hum Retroviruses* 30, 8-16.
- Loeb, L. A., Essigmann, J. M., Kazazi, F., Zhang, J., Rose, K. D. & Mullins, J. I. (1999). Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1492-1497.
- Loeffler, F. & Frosch, P. (1897). Summarischer Bericht ueber der Ergebnisse der Untersuchungen zur Erforschung der Maul-und-Klauenseuche. *Zent Bakt Parasitkde Abt I* 22, 257-259.
- Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3, 330-338.
- Lowe, J. K., Brox, L. & Henderson, J. F. (1977). Consequences of inhibition of guanine nucleotide synthesis by mycophenolic acid and virazole. *Cancer Res* 37, 736-743.
- Lyons, T., Murray, K. E., Roberts, A. W. & Barton, D. J. (2001). Poliovirus 5'-terminal cloverleaf RNA is required in cis for VPg uridylation and the initiation of negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 75, 10696-10708.
- M**aag, D., Castro, C., Hong, Z. & Cameron, C. E. (2001). Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J Biol Chem* 276, 46094-46098.
- Manrubia, S. C., Escarmis, C., Domingo, E. & Lazaro, E. (2005). High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies. *Gene* 347, 273-282.
- Marcotte, L. L., Wass, A. B., Gohara, D. W., Pathak, H. B., Arnold, J. J., Filman, D. J., Cameron, C. E. & Hogle, J. M. (2007). Crystal structure of poliovirus 3CD protein: virally encoded protease and precursor to the RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 81, 3583-3596.
- Martin, V., Abia, D., Domingo, E. & Grande-Perez, A. (2010). An interfering activity against lymphocytic choriomeningitis virus replication associated with enhanced mutagenesis. *J Gen Virol* 91, 990-1003.
- Martrus, G., Nevot, M., Andres, C., Clotet, B. & Martinez, M. A. (2013). Changes in codon-pair bias of human immunodeficiency virus type 1 have profound effects on virus replication in cell culture. *Retrovirology* 10, 78.
- Mateu, M. G., Da Silva, J. L., Rocha, E., De Brum, D. L., Alonso, A., Enjuanes, L., Domingo, E. & Barahona, H. (1988). Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology* 167, 113-124.
- McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Schiff, E. R., Shiffman, M. L., Lee, W. M., Rustgi, V. K., Goodman, Z. D., Ling, M. H., Cort, S. & Albrecht, J. K. (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339, 1485-1492.
- Melichar, B., Voboril, Z., Krajina, A., Malirova, E., Weiner, P., Nova, M., Ryska, A. & Dvorak, J. (2012). Hepatic arterial infusion of irinotecan, 5-Fluorouracil and leucovorin in patients with liver metastases from colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 32, 5487-5493.
- Melnick, J. L., Crowther, D. & Barrera-Oro, J. (1961). Rapid development of drug-resistant mutants of poliovirus. *Science* 134, 557.
- Mendez, R., Fritsche, M., Porto, M. & Bastolla, U. (2010). Mutation bias favors protein folding stability in the evolution of small populations. *PLoS Comput Biol* 6, e1000767.
- Mikkelsen, J. G. & Pedersen, F. S. (2000). Genetic reassortment and patch repair by recombination in retroviruses. *J Biomed Sci* 7, 77-99.
- Miller, S. & Krijnse-Locker, J. (2008). Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* 6, 363-374.

- Mirzayan, C. & Wimmer, E. (1994). Biochemical studies on poliovirus polypeptide 2C: evidence for ATPase activity. *Virology* 199, 176-187.
- Moreno, H., Gallego, I., Sevilla, N., de la Torre, J. C., Domingo, E. & Martin, V. (2011). Ribavirin can be mutagenic for arenaviruses. *J Virol*.
- Morgenstern, K. A., Landro, J. A., Hsiao, K., Lin, C., Gu, Y., Su, M. S. & Thomson, J. A. (1997). Polynucleotide modulation of the protease, nucleoside triphosphatase, and helicase activities of a hepatitis C virus NS3-NS4A complex isolated from transfected COS cells. *J Virol* 71, 3767-3775.
- Munyon, W. & Salzman, N. P. (1962). The incorporation of 5-fluoro-uracil into poliovirus. *Virology* 18, 95-101.
- Musier-Forsyth, K. (2010). RNA remodeling by chaperones and helicases. *RNA Biol* 7, 632-633.
- Myers, T. W. & Gelfand, D. H. (1991). Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* 30, 7661-7666.

- N**ayak, A., Goodfellow, I. G. & Belsham, G. J. (2005). Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *J Virol* 79, 7698-7706.
- Ng, K. K., Cherney, M. M., Vazquez, A. L., Machin, A., Alonso, J. M., Parra, F. & James, M. N. (2002). Crystal structures of active and inactive conformations of a caliciviral RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* 277, 1381-1387.
- Ng, K. K., Pendas-Franco, N., Rojo, J., Boga, J. A., Machin, A., Alonso, J. M. & Parra, F. (2004). Crystal structure of norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the active site cleft. *J Biol Chem* 279, 16638-16645.
- Ning, Q., Brown, D., Parodo, J., Catral, M., Gorczynski, R., Cole, E., Fung, L., Ding, J. W., Liu, M. F., Rotstein, O., Phillips, M. J. & Levy, G. (1998). Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol* 160, 3487-3493.
- Nowak, M. A. (1992). What is a quasispecies? *Trends In Ecol and Evol* 4, 118-121.

OIE <http://www.oie.int>.

- Osheroff, W. P., Beard, W. A., Wilson, S. H. & Kunkel, T. A. (1999). Base substitution specificity of DNA polymerase beta depends on interactions in the DNA minor groove. *J Biol Chem* 274, 20749-20752.

- P**age, T. & Connor, J. D. (1990). The metabolism of ribavirin in erythrocytes and nucleated cells. *Int J Biochem* 22, 379-383.
- Papageorgiou, N., Coutard, B., Lantiez, V., Gautron, E., Chauvet, O., Baronti, C., Norder, H., de Lamballerie, X., Heresanu, V., Ferte, N., Veessler, S., Gorbalenya, A. E. & Canard, B. (2010). The 2C putative helicase of echovirus 30 adopts a hexameric ring-shaped structure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 1116-1120.
- Pariente, N., Airaksinen, A. & Domingo, E. (2003). Mutagenesis versus inhibition in the efficiency of extinction of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 77, 7131-7138.
- Pariente, N., Sierra, S., Lowenstein, P. R. & Domingo, E. (2001). Efficient virus extinction by combinations of a mutagen and antiviral inhibitors. *J Virol* 75, 9723-9730.
- Pathak, H. B., Arnold, J. J., Wiegand, P. N., Hargittai, M. R. & Cameron, C. E. (2007). Picornavirus genome replication: assembly and organization of the VPg uridylylation ribonucleoprotein (initiation) complex. *J Biol Chem* 282, 16202-16213.
- Patton, J. R. (1993). Ribonucleoprotein particle assembly and modification of U2 small nuclear

- RNA containing 5-fluorouridine. *Biochemistry* 32, 8939-8944.
- Paul, A. V., Molla, A. & Wimmer, E. (1994). Studies of a putative amphipathic helix in the N-terminus of poliovirus protein 2C. *Virology* 199, 188-199.
- Paul, A. V., Rieder, E., Kim, D. W., van Boom, J. H. & Wimmer, E. (2000). Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* 74, 10359-10370.
- Perales, C., Agudo, R., Manrubia, S. C. & Domingo, E. (2011). Influence of mutagenesis and viral load on the sustained low-level replication of an RNA virus. *J Mol Biol* 407, 60-78.
- Perales, C., Mateo, R., Mateu, M. G. & Domingo, E. (2007). Insights into RNA virus mutant spectrum and lethal mutagenesis events: replicative interference and complementation by multiple point mutants. *J Mol Biol* 369, 985-1000.
- Pfeiffer, J. K. & Kirkegaard, K. (2003). A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 7289-7294.
- Pfeiffer, J. K. & Kirkegaard, K. (2005). Increased fidelity reduces poliovirus fitness under selective pressure in mice. *PLoS Pathogens* 1, 102-110.
- Pfister, T. & Wimmer, E. (1999). Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J Biol Chem* 274, 6992-7001.
- Pincus, S. E., Diamond, D. C., Emini, E. A. & Wimmer, E. (1986). Guanidine-selected mutants of poliovirus: mapping of point mutations to polypeptide 2C. *J Virol* 57, 638-646.
- Pincus, S. E. & Wimmer, E. (1986). Production of guanidine-resistant and -dependent poliovirus mutants from cloned cDNA: mutations in polypeptide 2C are directly responsible for altered guanidine sensitivity. *J Virol* 60, 793-796.
- Pinto, R. M., Aragones, L., Costafreda, M. I., Ribes, E. & Bosch, A. (2007). Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Res* 127, 158-163.
- Pringle, C. R. (1970). Genetic characteristics of conditional lethal mutants of vesicular stomatitis virus induced by 5-fluorouracil, 5-azacytidine, and ethyl methane sulfonate. *J Virol* 5, 559-567.
- R**ajkowitsch, L., Chen, D., Stampfl, S., Semrad, K., Waldsich, C., Mayer, O., Jantsch, M. F., Konrat, R., Blasi, U. & Schroeder, R. (2007). RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases. *RNA Biol* 4, 118-130.
- Randerath, K., Tseng, W. C., Harris, J. S. & Lu, L. J. (1983). Specific effects of 5-fluoropyrimidines and 5-azapyrimidines on modification of the 5 position of pyrimidines, in particular the synthesis of 5-methyluracil and 5-methylcytosine in nucleic acids. *Recent Results Cancer Res* 84, 283-297.
- Rankin, J. T., Jr., Eppes, S. B., Antczak, J. B. & Joklik, W. K. (1989). Studies on the mechanism of the antiviral activity of ribavirin against reovirus. *Virology* 168, 147-158.
- Rodriguez, P. L. & Carrasco, L. (1993). Poliovirus protein 2C has ATPase and GTPase activities. *J Biol Chem* 268, 8105-8110.
- Rodriguez, P. L. & Carrasco, L. (1995). Poliovirus protein 2C contains two regions involved in RNA binding activity. *J Biol Chem* 270, 10105-10112.
- Rowlands, D. J., Ed. (2003). Foot-and-mouth disease. *Virus Res* 91, 1-161.
- Rozovics, J. M. & Semler, B. L. (2010). Genome Replication I: the Players. In *The Picornaviruses*. Edited by E. D. E. Ehrenfeld, R. P. Ross: ASM Press, Washington, DC.
- Ruiz-Jarabo, C. M., Arias, A., Baranowski, E., Escarmís, C. & Domingo, E. (2000). Memory in viral quasispecies. *J Virol* 74, 3543-3547.

Rutman, R. J., Cantarow, A. & Paschkis, K. E. (1954). Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. I. The intracellular distribution of nucleic acids and protein in rat liver. *Cancer Res* 14, 111-114.

Sadeghipour, S., Bek, E. J. & McMinn, P. C. (2013). Ribavirin-resistant mutants of human enterovirus 71 express a high replication fidelity phenotype during growth in cell culture. *J Virol* 87, 1759-1769.

Samuelsson, T. (1991). Interactions of transfer RNA pseudouridine synthases with RNAs substituted with fluorouracil. *Nucleic Acids Res* 19, 6139-6144.

Samuilova, O., Krogerus, C., Fabrichny, I. & Hyypia, T. (2006). ATP hydrolysis and AMP kinase activities of nonstructural protein 2C of human parechovirus 1. *J Virol* 80, 1053-1058.

Sanchez-Aparicio, M. T., Rosas, M. F. & Sobrino, F. (2013). Characterization of a nuclear localization signal in the foot-and-mouth disease virus polymerase. *Virology* 444, 203-210.

Santi, D. V. & Hardy, L. W. (1987). Catalytic mechanism and inhibition of tRNA (uracil-5-)-methyltransferase: evidence for covalent catalysis. *Biochemistry* 26, 8599-8606.

Santi, D. V., McHenry, C. S. & Sommer, H. (1974). Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry* 13, 471-481.

Sanz-Ramos, M., Diaz-San Segundo, F., Escarmis, C., Domingo, E. & Sevilla, N. (2008). Hidden virulence determinants in a viral quasispecies in vivo. *J Virol* 82, 10465-10476.

Saunders, K. & King, A. M. (1982). Guanidine-resistant mutants of aphthovirus induce the synthesis of an altered nonstructural polypeptide, P34. *J Virol* 42, 389-394.

Saunders, K., King, A. M., McCahon, D., Newman, J. W., Slade, W. R. & Forss, S. (1985). Recombination and oligonucleotide analysis of guanidine-resistant foot- and-mouth disease virus mutants. *J Virol* 56, 921-929.

Severson, W. E., Schmaljohn, C. S., Javadian, A. & Jonsson, C. B. (2003). Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. *J Virol* 77, 481-488.

Shimizu, H., Agoh, M., Agoh, Y., Yoshida, H., Yoshii, K., Yoneyama, T., Hagiwara, A. & Miyamura, T. (2000). Mutations in the 2C region of poliovirus responsible for altered sensitivity to benzimidazole derivatives. *J Virol* 74, 4146-4154.

Shen, H., Sun, H. & Li, G. (2012). What is the role of motif D in the nucleotide incorporation catalyzed by the RNA-dependent RNA polymerase from poliovirus? *PLoS Comput Biol* 8, e1002851.

Sierra, M., Airaksinen, A., González-López, C., Agudo, R., Arias, A. & Domingo, E. (2007). Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe. *J Virol* 81, 2012-2024.

Sierra, S., Dávila, M., Lowenstein, P. R. & Domingo, E. (2000). Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis. Influence of viral load and fitness in loss of infectivity. *J Virol* 74, 8316-8323.

Simmonds, P. (2010). Recombination in the evolution of picornaviruses. In *The Picornaviruses*, pp. 229-237. Edited by E. Ehrenfeld, E. Domingo & R. P. Roos: ASM Press, Washington, DC:.

Sintchak, M. D. & Nimmesgern, E. (2000). The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacology* 47, 163-184.

Smith, E. C., Blanc, H., Vignuzzi, M. & Denison, M. R. (2013). Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS Pathog* 9, e1003565.

Sobrino, F., Dávila, M., Ortín, J. & Domingo, E. (1983). Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* 128, 310-

318.

- Sole, R. V. & Deisboeck, T. S. (2004). An error catastrophe in cancer? *J Theor Biol* 228, 47-54.
- Steil, B. P. & Barton, D. J. (2009). Cis-active RNA elements (CREs) and picornavirus RNA replication. *Virus Res* 139, 240-252.
- Steinhauer, D. A., Domingo, E. & Holland, J. J. (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* 122, 281-288.
- Stincarelli, M., Arvia, R., De Marco, M. A., Clausi, V., Corcioli, F., Cotti, C., Delogu, M., Donatelli, I., Azzi, A. & Giannecchini, S. (2013). Reassortment ability of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus with circulating human and avian influenza viruses: public health risk implications. *Virus Res* 175, 151-154.
- Stoker, M. & Macpherson, I. (1964). Syrian Hamster Fibroblast Cell Line BHK21 and Its Derivatives. *Nature* 203, 1355-1357.
- Streeter, D. G., Witkowski, J. T., Khare, G. P., Sidwell, R. W., Bauer, R. J., Robins, R. K. & Simon, L. N. (1973). Mechanism of action of 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 70, 1174-1178.
- Stuyver, L. J., Lostia, S., Patterson, S. E., Clark, J. L., Watanabe, K. A., Otto, M. J. & Pankiewicz, K. W. (2002). Inhibitors of the IMPDH enzyme as potential anti-bovine viral diarrhoea virus agents. *Antivir Chem Chemother* 13, 345-352.
- Sutmoller, P., Barteling, S. S., Olascoaga, R. C. & Sumption, K. J. (2003). Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Res* 91, 101-144.
- Sweeney, T. R., Cisnetto, V., Bose, D., Bailey, M., Wilson, J. R., Zhang, X., Belsham, G. J. & Curry, S. (2010). Foot-and-mouth disease virus 2C is a hexameric AAA+ protein with a coordinated ATP hydrolysis mechanism. *J Biol Chem* 285, 24347-24359.

Teterina, N. L., Egger, D., Bienz, K., Brown, D. M., Semler, B. L. & Ehrenfeld, E. (2001). Requirements for assembly of poliovirus replication complexes and negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 75, 3841-3850.

Teterina, N. L., Gorbalenya, A. E., Egger, D., Bienz, K. & Ehrenfeld, E. (1997). Poliovirus 2C protein determinants of membrane binding and rearrangements in mammalian cells. *J Virol* 71, 8962-8972.

Tian, W., Hwang, Y. T. & Hwang, C. B. (2008). The enhanced DNA replication fidelity of a mutant herpes simplex virus type 1 DNA polymerase is mediated by an improved nucleotide selectivity and reduced mismatch extension ability. *J Virol* 82, 8937-8941.

Toja, M., Escarmis, C. & Domingo, E. (1999). Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res* 64, 161-171.

Toltzis, P., O'Connell, K. & Patterson, J. L. (1988). Effect of phosphorylated ribavirin on vesicular stomatitis virus transcription. *Antimicrob Agents Chemother* 32, 492-497.

Vance, L. M., Moscufo, N., Chow, M. & Heinz, B. A. (1997). Poliovirus 2C region functions during encapsidation of viral RNA. *J Virol* 71, 8759-8765.

Verlinden, Y., Cuconati, A., Wimmer, E. & Rombaut, B. (2000). The antiviral compound 5-(3,4-dichlorophenyl) methylhydantoin inhibits the post-synthetic cleavages and the assembly of poliovirus in a cell-free system. *Antiviral Res* 48, 61-69.

Vignuzzi, M. & Andino, R. (2010). Biological implications of picornavirus fidelity mutants. In *The Picornaviruses*, pp. 213-227. Edited by E. Ehrenfeld, E. Domingo & R. P. Roos: ASM Press, Washington, DC.

Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E. & Andino, R. (2006). Quasispecies

- diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439, 344-348.
- Vignuzzi, M., Wendt, E. & Andino, R. (2008). Engineering attenuated virus vaccines by controlling replication fidelity. *Nat Med* 14, 154-161.
- Volkenstein, M. V. (1994). *Physical approaches to biological evolution*. Berlin: Springer-Verlag.
- W**alker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1, 945-951.
- Wang, C. C., Huang, Z. S., Chiang, P. L., Chen, C. T. & Wu, H. N. (2009). Analysis of the nucleoside triphosphatase, RNA triphosphatase, and unwinding activities of the helicase domain of dengue virus NS3 protein. *FEBS Lett* 583, 691-696.
- Webb, G. F. & Blaser, M. J. (2002). Dynamics of bacterial phenotype selection in a colonized host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3135-3140.
- Webster, R. G. (1999). Antigenic variation in influenza viruses. In *Origin and Evolution of Viruses*, pp. 377-390. Edited by E. Domingo, R. G. Webster & J. J. Holland. San Diego: Academic Press.
- Weissmann, C., Li, J., Mahal, S. P. & Browning, S. (2011). Prions on the move. *EMBO Rep* 12, 1109-1117.
- Willis, R. C., Carson, D. A. & Seegmiller, J. E. (1978). Adenosine kinase initiates the major route of ribavirin activation in a cultured human cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3042-3044.
- Wimmer, E. & Paul, A. V. (2010). The Making of a Picornavirus Genome. In *The Picornaviruses*. Edited by E. D. E. Ehrenfeld, R. P. Ross: ASM Press, Washington, DC.
- Woodson, S. A. (2010a). Compact intermediates in RNA folding. *Annu Rev Biophys* 39, 61-77.
- Woodson, S. A. (2010b). Taming free energy landscapes with RNA chaperones. *RNA Biol* 7, 677-686.
- Wray, S. K., Gilbert, B. E. & Knight, V. (1985a). Effect of ribavirin triphosphate on primer generation and elongation during influenza virus transcription in vitro. *Antiviral Res* 5, 39-48.
- Wray, S. K., Gilbert, B. E., Noall, M. W. & Knight, V. (1985b). Mode of action of ribavirin: effect of nucleotide pool alterations on influenza virus ribonucleoprotein synthesis. *Antiviral Res* 5, 29-37.
- Wu, J. Z., Larson, G., Walker, H., Shim, J. H. & Hong, Z. (2005). Phosphorylation of ribavirin and viramidine by adenosine kinase and cytosolic 5'-nucleotidase II: Implications for ribavirin metabolism in erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2164-2171.
- Y**ang, P. C., Chu, R. M., Chung, W. B. & Sung, H. T. (1999). Epidemiological characteristics and financial costs of the 1997 foot-and-mouth disease epidemic in Taiwan. *Vet Rec* 145, 731-734.
- Yang, X., Smidansky, E. D., Maksimchuk, K. R., Lum, D., Welch, J. L., Arnold, J. J., Cameron, C. E. & Boehr, D. D. (2012). Motif D of viral RNA-dependent RNA polymerases determines efficiency and fidelity of nucleotide addition. *Structure* 20, 1519-1527.
- Yin, J., Liu, Y., Wimmer, E. & Paul, A. V. (2007). Complete protein linkage map between the P2 and P3 non-structural proteins of poliovirus. *J Gen Virol* 88, 2259-2267.
- Yu, H., Eritja, R., Bloom, L. B. & Goodman, M. F. (1993). Ionization of bromouracil and fluorouracil stimulates base mispairing frequencies with guanine. *J Biol Chem* 268, 15935-15943.

- Z**eng, J., Wang, H., Xie, X., Yang, D., Zhou, G. & Yu, L. (2013). An increased replication fidelity mutant of foot-and-mouth disease virus retains fitness in vitro and virulence in vivo. *Antiviral Res* 100, 1-7.
- Zeng, J., Wang, H., Xie, X., Li, C., Zhou, G., Yang, D. & Yu, L. Ribavirin-Resistant Variants of Foot-and-Mouth Disease Virus: The Effect of Restricted Quasispecies Diversity on Viral Virulence. *J Virol.* en prensa.
- Zhou, J. H., You, Y. N., Chen, H. T., Zhang, J., Ma, L. N., Ding, Y. Z., Pejsak, Z. & Liu, Y. S. (2013). The effects of the synonymous codon usage and tRNA abundance on protein folding of the 3C protease of foot-and-mouth disease virus. *Infect Genet Evol* 16, 270-274.
- Zhou, S., Liu, R., Baroudy, B. M., Malcolm, B. A. & Reyes, G. R. (2003). The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA. *Virology* 310, 333-342.
- Zimmer, S. M. & Burke, D. S. (2009). Historical perspective--Emergence of influenza A (H1N1) viruses. *N Engl J Med* 361, 279-285.
- Zimmerman, T. P. & Deeprose, R. D. (1978). Metabolism of 5-amino-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide and related five-membered heterocycles to 5'-triphosphates in human blood and L5178Y cells. *Biochem Pharmacol* 27, 709-716.
- Zúñiga, S., Sola, I., Cruz, J. L. & Enjuanes, L. (2009). Role of RNA chaperones in virus replication. *Virus Res* 139, 253-266.

9 Anexo

Tabla A.1. Cambios de nucleótido y aminoácido de las poblaciones virales pasadas en ausencia de FU.

pMT28wt p10 -FU				pMT28(V173I) p10 -FU			
Mutación	Sustitución	PAM 250	Rep	Mutación	Sustitución	PAM 250	Rep
U6624C	-		1	U6620C	V4A	0	1
U6671C	L21P	-3	1	A6662G	K18R	3	1
C6704U	P32L	-3	1	A6689G	H27R	2	1
G6718A	A37T	1	1	G6706A	E33K	0	1
U6724C	-		1	U6838C	C77R	-4	1
C6765U	-		1	A6898G	S97G	1	1
A6771G	-		1	A6901G	I98V	4	1
A6802G	K65E	0	1	G6942A	M111I	2	1
U6843C	-		1	C6967U	P120S	1	1
A6880G	T91A	1	1	U7002C	-		1
A6948G	-		1	U7058C	M150T	-1	1
U6960C	-		1	A7066G	R153G	-3	1
G6997A	A130R	-2	1	U7167C	-		1
A7016G	N136S	1	1	U7180C	Y191H	0	1
G7027A	G140R	-3	1	A7216G	M203V	2	1
A7034G	E142G	0	1	C7227U	-		1
A7065G	-		1	U7253C	V215A	0	1
A7172G	H188R	2	1	C7254U	-		1
U7178G	L190R	-3	1	U7258C	C217R	-4	2
U7258C	C217R	-4	1	U7339A	F244I	1	1
U7272C	-		1	A7361G	D251G	1	1
A7274G	D222G	1	1	U7376C	M256T	-1	1
A7284G	-		1	U7433C	L275P	-3	1
A7291G	T228A	1	1	A7450G	T281A	1	1
G7300A	A231T	1	1	A7455G	-		1
U7339C	F244L	2	1	A7468G	N287D	2	1
A7349C	N247T	0	1	U7547C	I313T	0	1
G7386A	-		1	U7569C	-		1
U7390C	F261L	2	1	A7597G	T330A	1	1
A7412G	H268R	2	2	U7600A	Y331N	-2	1
A7468G	N287D	2	1	U7628C	I340T	0	1
U7509C	-		1	G7819A	A404T	1	1
C7563U	-		1	A7871G	Q421R	1	1
G7583A	G325E	0	1	Mutaciones totales		33	
C7613U	S335F	-3	1	Mutaciones sinónimas (%)		6 (18)	
A7695C	Q362H	3	1	Mutaciones no sinónimas (%)		27 (82)	
A7699G	I364V	4	1	A→G U→C que causan mutaciones NS (% de entre A→G U→C)		21 (84)	
A7714G	K369E	0	1	G→A C→U que causan mutaciones NS (% de entre G→A C→U)		4 (67)	
U7749C	-		2	Mutaciones no sinónimas repetidas (% de entre las NS)		1 (4)	
A7781G	H391R	2	1	Mutaciones no sinónimas con PAM250 < 0 (% de entre las NS)		7 (26)	
U7797C	-		1	Mutaciones no sinónimas con PAM250 = 0 (% de entre las NS)		6 (22)	
A7809C	K400N	1	1				
U7846C	S413P	1	1				
Mutaciones totales		43					
Mutaciones sinónimas (%)		15 (35)					
Mutaciones no sinónimas (%)		28 (65)					
A→G U→C que causan mutaciones NS (% de entre A→G U→C)		17 (59)					

G→A C→U que causan mutaciones NS (% de entre G→A C→U)	7 (70)	Mutaciones no sinónimas con PAM250 > 0 (% de entre las NS)	14 (52)
Mutaciones no sinónimas repetidas (% de entre las NS)	1 (4)		
Mutaciones no sinónimas con PAM250 < 0 (% de entre las NS)	7 (25)		
Mutaciones no sinónimas con PAM250 = 0 (% de entre las NS)	5 (18)		
Mutaciones no sinónimas con PAM250 > 0 (% de entre las NS)	16 (57)		

Los cambios son los encontrados en los espectros de la región codificante de 3D (nucleótidos 6610-7980) de las poblaciones pMT28wt y pMT28(V173I) (pasadas en ausencia de FU). Los clones analizados son los que se describen en las Tablas 5.2.1 y 5.2.2. Un guión (-) indica que la mutación es sinónima, Rep hace referencia al número de veces que esa mutación ha sido encontrada en la población y se muestra el valor de PAM250 (Feng & Doolittle, 1996) de las sustituciones encontradas. NS = mutación no sinónima.

Tabla A.2. Cambios de nucleótido y aminoácido de las distintas poblaciones virales pasadas en presencia de 400 µg/ml FU.

pMT28wt p10 FU 400 µg/ml				pMT28(V173I) p10 FU 400 µg/ml			
Mutación	Sustitución	PAM 250	Rep	Mutación	Sustitución	PAM 250	Rep
U6613C	-		1	U6617C	I3T	0	1
U6620C	V4A	0	2	U6620C	V4A	0	1
U6624C	-		1	U6624C	-		1
U6647C	V13A	0	1	A6632C	D8A	0	1
A6662G	K18R	3	10	U6633C	-		1
A6664G	T19A	1	1	G6634A	V9M	2	1
A6689G	H27R	2	1	A6654G	-		1
G6714A	-		1	A6662G	K18R	3	1
U6717C	-		1	U6671C	L21P	-3	1
A6741G	-		1	U6683C	V25A	0	1
U6744C	-		1	G6692A	G28D	1	1
U6746C	L46P	-3	1	U6697C	F30L	2	1
G6760A	V51I	4	1	U6729C	-		2
A6770G	E54G	0	1	G6735A	-		1
U6773C	V55A	0	2	U6744C	-		2
U6776C	I56T	0	2	G6755A	G49D	1	1
A6802G	K65E	0	1	U6773C	V55A	0	1
A6803G	K65R	3	2	U6776C	I56T	0	2
A6815G	E69G	0	1	G6794A	G62E	0	1
U6829C	F74L	2	1	U6827C	L73P	-3	1
U6830C	F74S	-3	1	A6858G	-		1
G6836A	R76H	2	1	U6902C	I98T	0	1
U6843C	-		1	A6930G	-		1
G6853A	A82T	1	1	C6933U	-		1
U6903C	-		1	G6972A	STOP		1
U6923C	V105A	0	1	A6986G	K126R	3	1
A6930G	-		1	C7020U	-		1
A6944G	E112G	0	1	G7024A	V139I	4	1
G6949A	D114N	2	1	A7071G	-		1

C6951U	-		1	U7072C	Y155H	0	1
U6966C	-		1	U7083C	-		1
C7005U	-		1	C7086U	-		1
U7009C	F134L	2	1	U7164C	-		1
A7029G	-		1	U7164G	-		1
U7037C	V143A	0	1	G7165A	V186I	4	1
A7066G	R153G	-3	1	A7172G	H188R	2	1
A7068G	-		1	A7192G	M195V	2	1
A7070G	E154G	0	1	A7203G	-		1
U7079C	F157S	-3	1	A7226G	N206S	1	1
G7101A	-		1	G7236A	-		1
C7104U	-		1	U7257C	-		1
A7125G	-		2	G7267A	D220N	2	1
A7128G	-		3	U7275C	-		2
A7141G	T178A	1	1	C7329U	-		1
U7157C	V183A	0	1	A7331G	Y241C	0	1
U7158C	-		1	G7336A	A243T	1	1
A7195G	I196V	4	1	U7339C	F244L	2	1
A7203G	-		1	C7350U	-		1
U7241C	I211T	0	1	A7357G	S250G	1	1
U7242C	-		1	U7378C	F257L	2	3
U7253C	V215A	0	1	A7400G	E264G	0	1
A7268G	D220G	1	1	U7402C	F265L	2	1
A7274G	D222G	1	1	A7429G	I274V	4	3
U7298C	F230S	-3	1	A7438G	T277A	1	1
U7316C	V236A	0	1	A7463G	Y285C	0	1
A7348G	N247D	2	1	A7472G	K288R	3	1
U7378C	F257L	2	1	U7478C	I290T	0	1
U7402C	F265L	2	2	C7479U	-		1
C7407U	-		2	U7484C	V292A	0	1
G7425A	-		1	U7507C	C300R	-4	1
U7430C	I274T	0	1	U7523C	I305T	0	1
A7472G	K288R	3	1	U7526C	I306T	0	1
G7475A	R289H	2	1	U7536C	-		1
U7482C	-		1	U7537C	-		1
U7484C	V292A	0	2	U7547C	I313T	0	1
A7488G	-		1	A7559G	Y317C	0	1
A7516G	T303A	1	1	A7572G	-		3
U7542C	-		2	U7576C	Y323H	0	1
U7547C	I313T	0	1	U7617C	-		1
A7550G	Y314C	0	1	C7626U	-		1
A7559G	Y317C	0	2	C7637U	A343V	0	1
U7564C	-		1	U7645C	Y346H	0	1
U7565C	L319S	-3	2	U7647C	-		1
U7617C	-		1	U7650C	-		1
U7628C	I340T	0	1	A7661G	E351G	0	1
U7650C	-		1	A7670G	K354R	3	1
A7661G	E351G	0	1	G7671A	-		2
C7672U	P355S	1	1	A7681G	K358E	0	1
C7677U	-		1	A7682G	K358R	3	1
U7678C	F357L	2	1	U7684C	S359P	1	1
A7683G	-		4	C7692U	-		1
U7704C	-		1	C7698U	-		2
A7715G	K369R	3	1	U7704C	-		1
A7725G	-		1	A7716G	-		1
U7728C	-		1	U7730C	F374S	-3	1
U7729C	F374L	2	1	U7731C	-		1
U7733C	V375A	0	1	U7734C	-		1
U7749C	-		15	U7744C	S379P	1	1
A7750G	T381A	1	1	C7745U	S379F	-3	1
A7790G	Y394C	0	1	U7761C	-		2
U7883C	I425T	0	1	A7769G	K387R	3	1
C7887U	-		1	A7770G	-		1

A7896G	-		1	A7773G	-		1
U7945C	F446L	2	1	C7782U	-		2
U7957C	F450L	2	1	U7788C	-		4
A7963G	I452V	4	1	U7801C	F398L	2	1
Mutaciones totales		96		U7839C	-		1
Mutaciones sinónimas (%)		37 (39)		U7841C	I411T	0	1
Mutaciones no sinónimas (%)		59 (61)		C7857U	-		1
A→G U→C que causan mutaciones NS (% de A→G U→C)		53 (65)		U7883C	I425T	0	1
G→A C→U que causan mutaciones NS (% de entre G→A C→U)		6 (100)		A7893G	-		1
Mutaciones no sinónimas repetidas (% de entre las NS)		9 (15)		A7896G	-		1
Mutaciones no sinónimas con PAM250 < 0 (% de entre las NS)		6 (10)		G7939A	E444K	0	1
Mutaciones no sinónimas con PAM250 = 0 (% de entre las NS)		25 (42)		Mutaciones totales		103	
Mutaciones no sinónimas con PAM250 > 0 (% de entre las NS)		28 (47)		Mutaciones sinónimas (%)		45 (44)	
A→G U→C con PAM250 < 0 (% de entre A→G U→C)		6 (7)		Mutaciones no sinónimas (%)		57 (55)	
				Codones de parada		1	
				A→G U→C que causan mutaciones NS (% de entre A→G U→C)		45 (60)	
				G→A C→U que causan mutaciones NS (% de entre G→A C→U)		11 (42)	
				Mutaciones no sinónimas repetidas (% de entre las NS)		3 (5)	
				Mutaciones no sinónimas con PAM250 < 0 (% de entre las NS)		5 (9)	
				Mutaciones no sinónimas con PAM250 = 0 (% de entre las NS)		26 (46)	
				A→G U→C con PAM250 > 0 (de entre A→G U→C)		26 (46)	
				A→G U→C con PAM250 < 0 (% de entre A→G U→C)		4 (5)	

Los cambios son los encontrados en los espectros de la región codificante de 3D (nucleótidos 6610-7980) de las poblaciones pMT28wt y pMT28(V173I) (pasadas en presencia de 400 µg/ml FU). Los clones analizados son los que se describen en las Tablas 5.2.1 y 5.2.2. Un guión (-) indica que la mutación es sinónima, Rep hace referencia al número de veces que esa mutación ha sido encontrada en la población y se muestra el valor de PAM250 (Feng & Doolittle, 1996) de las sustituciones encontradas. NS = mutación no sinónima.